

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

SUR UNE MALADIE PARASITAIRE DE L'HOMME
TRANSMISSIBLE AU LAPIN

PAR MM.

DU CAZAL,

médecin principal de 2^e classe,
professeur au Val-de-Grâce.

ET

VAILLARD,

médecin-major de 1^{re} classe, professeur
agrégé du Val-de-Grâce.

Au mois de mai 1890 a succombé, dans le service de l'un de nous, un malade atteint d'une affection aussi singulière par ses symptômes et son évolution que par la nature et la localisation des lésions qui la caractérisaient; au foyer de celles-ci existait, à l'état de pureté, un bacille spécial dont les cultures, inoculées au lapin, ont déterminé sur cet animal la reproduction à peu près exacte des altérations observées chez l'homme. Cette affection, de cause microbienne, ne paraissant correspondre à aucune des maladies actuellement décrites en pathologie humaine, nous avons cru utile d'en donner mention.

Nous relaterons d'abord l'observation clinique et les détails de l'autopsie, puis les recherches bactériologiques et expérimentales auxquelles le fait a donné lieu.

M. P..., âgé de 33 ans, médecin de 2^e classe de la marine, entre à l'hôpital du Val-de-Grâce le 28 avril 1890.

C'est un homme exceptionnellement fort et vigoureux; il est très gras et présente en même temps des masses musculaires herculéennes.

M. P... a eu, étant aux colonies, il y a plusieurs années, une dysenterie qui a plusieurs fois récidivé.

Il se plaint de souffrir depuis longtemps d'une dilatation de l'estomac

qui a été, dans ces derniers temps, très améliorée par des prises de naphtol.

Le malade s'est senti plus souffrant vendredi 25 avril; il a pris le lit le 26. Le 29, se sentant plus mal, il a fait prier un de ses collègues de venir le voir; celui-ci, trouvant son état assez alarmant, demande son admission immédiate à l'hôpital du Val-de-Grâce.

Nous voyons M. P..., pour la première fois, ce même jour, à trois heures. Il est très agité, ne pouvant trouver dans son lit aucune position satisfaisante, et nous dit n'avoir pu dormir depuis deux jours. Son œil est brillant; son pouls plein et large. Sa langue est blanche, sans rougeur sur les bords. Pas de céphalalgie proprement dite, mais cependant le malade dit que sa tête est lourde. Temp. axillaire : 38°, 3.

Les viscères abdominaux paraissent avoir leurs dimensions normales : pas d'apparence de dilatation stomacale.

A la palpation le ventre ne présente qu'un peu de sensibilité sans localisation précise; il y a un peu de diarrhée depuis deux jours, et le malade se plaint très vivement de tranchées extrêmement violentes et douloureuses.

L'auscultation ne révèle rien dans les poumons; le malade ne tousse pas et n'a jamais toussé. Aucun trouble apparent du côté du cœur.

Le lendemain matin (29 avril) le malade se sent mieux. Temp. : 38° 4. La langue est toujours blanche et épaisse; la bouche extrêmement sèche. Un ipéca administré la veille n'a pas provoqué de vomissements, mais a déterminé une diarrhée abondante qui persiste encore. Le ventre est modérément ballonné et un peu sensible dans toute son étendue. Insomnie et agitation très grande.

Température du soir : 37° 8.

30 avril. Le malade se plaint de n'avoir pas fermé l'œil de la nuit, qu'il a passée dans une agitation extrême. La bouche et la langue sont sèches, la soif extrêmement vive. La diarrhée persiste; trois garde-robés pendant la nuit.

La miction devient difficile et même un peu douloureuse.

Le ventre n'est pas plus ballonné que la veille, mais il est plus sensible; cette sensibilité, tout en étant générale, est cependant plus vive au niveau du fond de la vessie; elle l'est au contraire beaucoup moins au niveau des fosses iliaques et du creux épigastrique.

Temp. Matin : 38° 1. Soir : 39° 3.

Dans la soirée, l'état est sensiblement le même; le 1^{er} mai, à la visite du matin, le mal a fait depuis la veille des progrès effrayants. L'aspect du malade est celui d'un cholérique à la période algide ou d'un homme succombant à un empoisonnement: après avoir subdéliré pendant la nuit, il est aphone, la face est couverte de sueurs visqueuses, les yeux sont enfouis dans les orbites qui ont pris une couleur bistre foncée; les mains sont glacées; le pouls absolument imperceptible.

Le ventre est extrêmement ballonné, douloureux et sensible dans toute son étendue comme la veille; mais, plus que la veille encore, cette sensibilité est beaucoup plus vive quand la pression porte au niveau du fond de la vessie.

Temp. Matin : 39° 3. Soir : 39° 6.

Vers cinq heures du soir, le malade succombe presque subitement.

AUTOPSIE, faite le 3 mai, 36 heures après la mort.

Thorax. — Les organes thoraciques ne présentent aucune altération.

Abdomen. — La paroi abdominale est tapissée d'une couche adipeuse sous-cutanée de trois centimètres d'épaisseur; l'épiploon est également surchargé de graisse.

Sur toute l'étendue du péritoine pariétal sont disséminés des nodules blancs jaunâtres, arrondis, à peine saillants, de consistance molle, dont le volume varie depuis celui d'un grain de millet jusqu'à celui d'une lentille. Ces petites tumeurs, bien limitées à leur pourtour, siègent sous le péritoine ou dans l'épaisseur même de la séreuse; elles contiennent une substance caséiforme, blanc jaunâtre, onctueuse et grasse au toucher, rappelant celle que l'on trouve dans les kystes dermoïdes. En dehors des points lésés la séreuse ne présente aucune modification apparente.

Des nodules identiques, mais plus abondants encore, se retrouvent sur le mésentère et le grand épiploon; la lame postérieure de ce dernier en est pour ainsi dire criblée. La confluence de ces nodules augmente d'une manière très sensible à mesure qu'on se rapproche du pancréas. Leur nombre total peut être évalué à plusieurs milliers. En arrière du grand épiploon, les anses intestinales sont agglutinées par un exsudat fibrineux, récent, indice d'une péritonite subaiguë localisée.

Le pancréas est augmenté de volume et induré. A la coupe, la trame conjonctive paraît épaisse; elle est, en outre, parsemée de foyers nodulaires absolument semblables par leur forme générale et leur contenu à ceux qui existent sur le péritoine. Au niveau de la tête de l'organe, un de ces foyers a acquis le volume d'une grosse noisette, son centre est occupé par une matière puriforme, blanc jaunâtre. La substance glandulaire ne paraît pas altérée à l'œil nu; les nodules signalés siègent exclusivement dans le tissu conjonctif constituant de la glande.

Les ganglions mésentériques sont légèrement tuméfiés et rouges.

Le foie est un peu congestionné; dans son épaisseur existe un noyau du volume d'une noisette, à contenu caséiforme, blanc jaunâtre, semblable à celui des nodules péritonéaux. La rate et les reins sont normaux.

L'estomac, non dilaté, ne montre aucune altération; l'intestin, examiné dans toute sa longueur, paraît absolument sain.

Les seules lésions constatées se résument donc dans une éruption confluente de nodules spéciaux, d'aspect caséiforme, sur presque toute l'étendue de la séreuse péritonéale, et dans l'infiltration du pancréas par des tumeurs de même nature, plus volumineuses en ce point que partout ailleurs; il semble que cet organe ait été le siège primitif de l'affection, qui de là se serait étendue au péritoine pariétal, au mésentère et à l'épiploon. Le foie, peu atteint, n'a présenté qu'un seul foyer de la même lésion. Enfin une péritonite subaiguë récente faisait adhérer entre elles quelques anses intestinales.

Examen des nodules à l'état frais et sur les coupes après durcissement. — Le contenu des nodules péritonéaux ou pancréatiques, examiné à l'état frais, est formé par une matière amorphe caséograisseuse, ne contenant aucun élément cellulaire bien distinct. La coloration par le bleu de Loeffler y montre l'existence de quelques bacilles courts, un peu plus longs que larges, à bouts arrondis, prenant mal la couleur et se décolorant par le procédé de Gram. Tous les ensements faits avec le contenu de ces nodules ont donné lieu au développement d'un même bacille dont les caractères seront décrits ci-dessous.

Les coupes intéressant le pancréas ont été surtout utilisées pour l'étude histologique des lésions. Sur les préparations colorées par le picro-carminate d'ammoniaque, les foyers caseiformes constatés dans cet organe à l'autopsie se distinguent aisément. Ils sont, en général, de forme irrégulière et disposés suivant la direction des travées conjonctives ; leur siège est, en effet, dans la trame cellulaire du pancréas, mais leurs limites empiètent parfois sur le tissu glandulaire, qui se trouve alors intéressé dans l'altération. La partie centrale de ces foyers, en voie de désagrégation, est constituée par un amas de leucocytes incolores et de débris cellulaires teints ou non par le carmin. A la périphérie de cette portion centrale se dispose un reticulum fibrinoïde, à travées épaisses, circonscrivant des mailles de dimensions inégales, remplies de leucocytes dégénérés, sans noyau distinct, réfractaires à la coloration ou bien uniformément teints en rouge vif par le carmin, et d'aspect vitreux. Les vaisseaux compris dans l'une et l'autre zone présentent des parois épaissies, comme vitrifiées ; leur cavité est oblitérée par un thrombus homogène, également vitreux. En dehors des points restreints où les acini sont impliqués dans cette mortification des éléments, le tissu glandulaire ne présente aucune altération appréciable. Les lésions constatées se résument donc dans des foyers de nécrose offrant tous les caractères de la nécrose de coagulation.

A l'examen des préparations colorées au bleu de Loeffler et vues à un faible grossissement, les points nécrosés se dessinent comme des taches claires, teintées en bleu très pâle, quelquefois même incolores. Sur ce fond tranchent des îlots ou des traînées très vivement colorées en bleu, et qui, à un fort grossissement, apparaissent constituées par des aggrégations de bacilles. Ceux-

ci abondent surtout au centre du foyer de nécrose; tantôt ils s'y présentent en amas considérables, cohérents, isolés ou reliés entre eux; tantôt ils sont infiltrés dans la masse des éléments mortifiés sous forme de trainées plus ou moins confluentes. Sur toutes les préparations, le nombre des bacilles est considérable au centre des foyers nécrosés. Ils existent aussi, mais beaucoup moins nombreux, dans le réseau fibrinoïde de la périphérie, et y sont plutôt infiltrés que groupés en amas. Leur présence est rare aux limites de la lésion; on ne les retrouve plus dans les portions saines de la glande.

Ces bacilles, identiques à ceux qui avaient été vus dans le contenu des nodules, répondent à une seule et même espèce; ce sont des bâtonnets très courts, deux fois plus longs que larges, à bouts arrondis, isolés ou articulés. La plupart prennent d'une manière homogène le bleu de Loeffler ou la solution aqueuse de violet de gentiane, de fuchsine; d'autres ne se teignent qu'à leurs extrémités et montrent un espace clair à leur centre (pl. IX, fig. 4). Tous se décolorent par la méthode de Gram.

Cultures. — *Caractères du microbe.* — L'ensemencement sur différents milieux (bouillon, gélatine, gélose) du contenu des nodules recueillis à l'autopsie a donné invariablement des cultures pures d'un microbe toujours identique. C'est un bâtonnet mobile, très court, à peine plus long que large, à bouts arrondis, et dont les dimensions sont en général moindres que celles du microbe observé sur les préparations provenant du malade. Ses articles sont tantôt isolés, tantôt géminés, quelquefois groupés en chaînettes de 10, 15 éléments et même plus. Les bacilles isolés ou disposés par deux sont doués d'un double mouvement très vif de translation et d'oscillation; les longues chaînettes n'ont qu'un mouvement lent, onduleux, flexueux.

Examiné vivant et sans coloration, le bâtonnet présente vaguement l'aspect d'un huit de chiffre et paraît entouré d'une mince zone claire qui lui constitue comme une enveloppe; mais après imprégnation par une solution aqueuse de fuchsine, de violet de gentiane ou de méthyle, on ne constate pas d'image traduisant l'existence d'une capsule véritable. La coloration obtenue n'est pas uniforme dans la longueur du bâtonnet. Ses pôles seuls se teintent vivement tandis que sa partie médiane

reste pâle ou incolore; l'espace clair central est limité latéralement par deux traits colorés. Le microbe ne se colore pas par le procédé de Gram.

Le bacille est indifféremment aérobio et anaérobio. Il prospère rapidement à l'étuve à 37°, mais se cultive aussi, quoique plus lentement, à la température de 45°.

Ensemencé dans du bouillon de bœuf ou de veau neutre, il trouble le milieu en 24 heures, et forme au fond du vase un dépôt blanchâtre, épais et floconneux; le liquide reste d'un louche laiteux et sa réaction est devenue très alcaline.

Inoculé en gélatine, par piqûre, il produit en 24 heures une série de colonies punctiformes, blanchâtres, le long du trait d'ensemencement. A la surface, la végétation est plus abondante, et déjà après 48 heures détermine une liquéfaction du milieu qui progresse lentement par tranches successives, de la superficie à la profondeur; sur la portion non liquéfiée de la gélatine s'accumule un dépôt blanc, floconneux.

Ensemencé en strie sur gélose, le bacille donne, après 24 heures à la température de 37°, une culture humide, opaline, translucide, qui s'étend rapidement au delà du trait d'inoculation et recouvre toute la surface du tube d'une couche mince et uniforme. Ultérieurement la culture s'épaissit un peu, devient blanchâtre, d'aspect crémeux, tout en gardant sa transparence.

Sur pomme de terre, la culture est abondante, épaisse, saillante, humide, un peu visqueuse, d'abord d'un jaune clair, puis d'un jaune brun; la végétation ne se limite pas au point inoculé et envahit rapidement la surface de la tranche.

Toutes ces cultures dégagent une odeur spéciale, légèrement ammoniacale, rappelant celle de l'urine putréfiée. Conservées à l'air libre, elles gardent leur vitalité pendant plusieurs mois; enfermées en tubes clos, à l'abri de l'air et de la lumière, elles sont encore revivisfciables après un an.

Ce microbe ne paraît pas former de spores. Un chauffage de 45 minutes à 60°, en milieu humide, le fait périr; mais, après dessiccation, il résiste pendant 5 minutes à la température de 100°.

Inoculation à l'animal. — Les cultures obtenues sont pathogènes pour la souris et le lapin; elles ne produisent aucun effet sur le cobaye, même à dose élevée.

Chez la souris blanche, l'inoculation sous la peau de 1/8 de centimètre cube d'une culture en bouillon datant de deux jours détermine la mort en 48 ou 60 heures, sans lésions spéciales, soit au point infecté, soit ailleurs; mais le bacille s'est disséminé dans le sang et les organes, où il est facile de le déceler par la culture.

Chez le lapin les résultats varient suivant la dose inoculée et le mode d'inoculation employé.

L'injection dans le sang de un centimètre cube d'une culture récente en bouillon provoque une maladie à évolution rapide, mortelle en 36 ou 50 heures, caractérisée surtout par une diarrhée fétide et de la parésie des membres. A l'autopsie on ne constate aucune lésion marquante; les ensemencements faits avec le sang, le foie, la rate, etc., donnent toujours lieu au développement du bacille spécifique.

A dose moindre (demi-centimètre cube) l'injection dans le sang est suivie d'une maladie chronique, marquée au début par de la diarrhée et un amaigrissement transitoires, puis par l'apparition, en différents points du corps, de tumeurs multiples qui rappellent exactement, par leur aspect général et la nature de leur contenu, les nodules caséiformes décrits chez le malade. L'affection ainsi produite est exceptionnellement mortelle; elle est même compatible avec une bonne santé générale lorsque les néoformations ne siègent pas au voisinage d'un organe important, et se termine par guérison après évacuation spontanée du contenu des tumeurs.

Les tumeurs prennent ordinairement naissance dans le tissu cellulaire sous-cutané. Une seule fois, en effet, elles se sont développées dans la cavité thoracique. Tel a été le cas de l'unique lapin qui ait succombé. La mort est alors survenue au 25^e jour, précédée de diarrhée, d'une ophtalmie double et d'un amaigrissement progressif. Dans le thorax, de chaque côté de la colonne vertébrale, existait un chapelet de tumeurs contigües, molles, arrondies, blanc jaunâtres, du volume d'un gros pois et même d'une cerise (pl. IX, fig. 2). Les néoformations, au nombre de huit du côté droit et de sept du côté gauche, comblaient les gouttières costo-vertébrales, n'offrant aucune connexion intime soit avec les os ou le périoste, soit avec les vaisseaux de la région; elles étaient entourées par une atmosphère de tissu

cellulaire hyperémie et œdématié. L'une de ces nodosités, plus volumineuse que les autres, avait comprimé l'aorte thoracique et déterminé l'oblitération de ce vaisseau par un thrombus local sur une longueur de trois centimètres: cette obstruction vasculaire n'avait sans doute pas été étrangère à la mort. En aucun autre point du corps il n'existaient de tumeurs similaires, et les viscères ne présentaient pas d'altération notable.

Chez les autres lapins inoculés comme le précédent, les tumeurs se sont exclusivement développées dans le tissu cellulaire sous-cutané, en nombre variable de deux à six, et sans prédisposition particulière pour telle ou telle région. Elles apparaissaient de un à deux mois après l'inoculation, tantôt simultanément, tantôt successivement sur les régions cervicale, dorsale, abdominale. C'étaient, au début, des petites nodosités de consistance élastique, indolores, roulant sous le doigt. Par une croissance lente, elles atteignaient le volume d'une grosse châtaigne, et constituaient alors des masses molles rénitentes, toujours mobiles sous la peau. Puis elles s'ulcéraient à leur point culminant et laissaient échapper une substance blanc jaunâtre, semi-fluide, puriforme; à cette ouverture spontanée succédait une ulcération fongueuse, à bords indurés, lente à cicatriser. Après la disparition de ces tumeurs, il ne s'en produisait pas de nouvelles, la guérison était complète. Quelques animaux portant des tumeurs sous-cutanées ont été sacrifiés au cours de leur maladie, et à des périodes variables après l'inoculation: l'examen le plus attentif n'a décelé chez eux aucune altération des viscères et des cavités splanchniques.

L'inoculation, sous la peau, d'une quantité variant entre 1 et 3 centimètres cubes de culture récente en bouillon, détermine les mêmes effets que l'injection de doses modérées dans le sang, c'est-à-dire une maladie chronique et curable. Les animaux présentent alors de la diarrhée, un amaigrissement progressif; puis, après un ou deux mois, on voit apparaître dans le tissu conjonctif sous-cutané, tantôt à la région inoculée, tantôt ailleurs, des tumeurs multiples évoluant, comme précédemment, sans lésions viscérales. La marche de la maladie est d'ailleurs celle qui a été indiquée déjà.

Les tumeurs, internes ou externes, observées chez les lapins inoculés, ont présenté des caractères uniformes. A part le volume,

elles reproduisaient d'une manière complète, par l'aspect extérieur et surtout la nature du contenu, les lésions constatées sur le malade : leur structure, toujours simple, se réduisait à une coque fibreuse, mince, lisse, transparente, distendue par une matière blanc jaunâtre, caséiforme ou caséo-graisseuse, histologiquement semblable à celle que montraient les nodules du malade. Dans les tumeurs récentes, les colorations permettaient de déceler, en très petit nombre il est vrai, le bacille inoculé; mais il n'existe plus de microbes colorables dans les productions anciennes, alors cependant que les ensemencements faits avec leur contenu donnaient toujours lieu au développement abondant du bacille spécifique. Chez tous les animaux, le microbe pathogène n'a pu être trouvé qu'au niveau des lésions caractéristiques et nulle part ailleurs ; il ne saurait être douteux que chez notre malade, comme chez les animaux, l'apparition des nodules ou tuméfactions ne soit la conséquence de la pullulation du bacille en tel ou tel point des tissus.

Des détails ci-dessus il ressort que le sujet dont l'histoire fait l'objet de cette note a succombé à une affection parasitaire, caractérisée au point de vue anatomique par la formation de nodules caséiformes dans le péritoine et le pancréas. Ces lésions avaient pour cause immédiate l'évolution *in situ* d'un bacille spécial, différent de ceux qui sont actuellement connus comme pathogènes pour l'homme, et qui, inoculé au lapin, a reproduit chez lui des lésions en foyers semblables à celles du malade.

L'affection décrite est-elle nouvelle ? Il est difficile de l'apprécier ; du moins, nous n'en avons pas trouvé l'analogie dans les publications médicales. Sans doute, si pareille maladie a été observée chez l'homme, elle a dû être confondue avec la tuberculose, dont les nodules jaunes et caséifiés présentent assez exactement l'apparence offerte par les altérations que nous avons eues sous les yeux.

PLANCHE IX, EXPLICATION DES FIGURES

FIG. I. — Bacilles dans un nodule pancréatique de l'homme.

FIG. II. — Tumeurs à contenu caséiforme observées chez un lapin qui a succombé le 23^e jour après l'inoculation d'une culture dans le sang.

DU SORT DES SPORES DE MICROBES DANS L'ORGANISME ANIMAL,

PAR M. LE DOCTEUR TRAPEZNIKOFF, DE SAINT-PÉTERSBOURG.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff, à l'Institut Pasteur.)

Tout être vivant semble condamné, vis-à-vis des microbes pathogènes qui l'entourent, à une lutte incessante, qui est surtout périlleuse lorsque ces microbes sont à l'état de germes, de spores résistantes. L'importance étiologique de ces spores n'est plus douteuse, et dès lors on est conduit à se demander comment s'organise la résistance vis-à-vis d'elles. Disparaissent-elles ou non dans un organisme doué de l'immunité? Si elles disparaissent, sous quelle influence le font-elles? Est-ce sous celle des éléments cellulaires, ou des liquides de l'organisme, ou sous les deux à la fois? Si elles ne disparaissent pas tout de suite, combien de temps conservent-elles leur vitalité, et pourquoi ne la manifestent-elles pas dans l'organisme?

Il y aurait un grand intérêt, tant scientifique que pratique, à résoudre cette question, et pourtant elle n'a guère été étudiée qu'en passant, au cours d'autres études bactériologiques. J'ai essayé d'en faire une étude systématique, et de rechercher ce que devenaient des spores de microbes pathogènes, ou non pathogènes, introduites dans l'organisme d'animaux réfractaires ou non réfractaires.

I

Metchnikoff¹ a montré le premier que des spores de microbes pathogènes peuvent périr dans l'organisme animal. A propos d'une maladie infectieuse des Daphnies qu'il a appelée *Spross-*

1. Archives de Virchow, 1884, t. IX.

pilzkrankheit, et qui est produite par un parasite qu'il a nommé *Monospora bicuspidata*, il a fait voir que les spores de ce parasite étaient saisies par les leucocytes de la *Daphnie*, qui les modifiaient peu à peu et finissaient par en faire une masse amorphe.

La destruction des spores par les leucocytes et les cellules fixes a été depuis constatée par d'autres savants, par Ribbert¹, pour l'*Aspergillus fumigatus*, l'*A. flavescens* et diverses espèces de mucor; par Hildebrand² aussi pour l'*A. fumigatus*; par Enderlen³, Vaillard et Vincent⁴ pour le bacille du tétanos. Les recherches de Vaillard et Vincent sont particulièrement intéressantes, car elles ont conduit ces savants à expliquer certains faits étiologiques jusqu'ici très obscurs. Vaillard et Vincent ont notamment démontré que les spores du bacille du tétanos, débarrassées de toxines par le lavage, sont rapidement saisies par les leucocytes, qui les modifient et finissent par les faire disparaître.

D'un autre côté Wyssokovitch⁵ a montré qu'un bacille inoffensif comme le *B. subtilis* peut conserver près de six mois sa vitalité dans un organisme animal. Smirnof⁶ a de même vu des spores du bacille charbonneux persister pendant des semaines, et Bitter⁷ a trouvé que ces mêmes spores pouvaient conserver au moins 19 jours leur virulence et leur vitalité dans le corps de moutons doués de l'immunité. Lubarsch⁸ a retiré des semences fécondes d'une grenouille qu'il avait inoculée 23 jours auparavant avec des spores charbonneuses, en allant puiser ces semences dans le foie ou les tissus voisins du point d'inoculation. Fischel⁹ a retrouvé les mêmes résultats.

Dans une autre direction, Arloing, Cornevin et Thomas¹⁰ ont vu les spores du charbon symptomatique conserver 12 jours leur

1. La destruction des champignons pathogènes dans le corps, Bonn, 1887.

2. Ziegler's *Beiträge*, t. II.

3. Deutsche Zeitschr. f. Thiermed., t. XV, p. 50.

4. Ces Annales, 1891, n° 1.

5. Deutsche med. Wochenschr., 1891, n° 42, p. 456.

6. Zeitschr. f. Hyg., t. IV, p. 231.

7. Ibid., p. 291.

8. Recherches sur les causes de l'immunité naturelle ou acquise, Berlin, 1891, p. 89.

9. Fortschritte d. Medizin, t. XI, n° 2, 1891.

10. Le charbon symptomatique du bœuf, Paris, 1887, 2^e édition.

vitalité et leur virulence dans le corps d'une grenouille laissée à la température ordinaire.

Ainsi, en résumé, il y a des cas où les spores pathogènes périssent dans l'animal vivant, et d'autres où elles y conservent leur vitalité et leur virulence. De quoi dépendent des résultats aussi divers? C'est ce qu'on peut essayer de voir en s'adressant à un animal très réfractaire au charbon, comme la grenouille.

Metchnikof a fait voir que les spores du *B. anthracis* se développent facilement dans le corps de la grenouille, à la seule condition d'être protégées contre les leucocytes au moment de leur pénétration. Dans la chambre antérieure de l'œil d'une grenouille conservée à 18-22°, elles ne rencontrent que peu ou pas de leucocytes et se développent. Sous la peau du même animal, elles se développent aussi, à la condition d'être protégées contre les globules blancs par un sac de papier buvard, d'ouate, ou un lambeau d'intestin (Petruschky), qui ne laisse passer que les liquides, et présente un léger obstacle à la pénétration des leucocytes. En dehors de cette protection, elles périssent, et dans des préparations de lymphé faites 3 jours après l'introduction directe de spores dans le sac lymphatique du dos de la grenouille, Metchnikof a vu que ces spores se coloraient mal et étaient contenues dans les leucocytes. Hueppe, qui a vérifié les résultats de ces expériences, les représente comme un *experimentum crucis* de la théorie des phagocytes.

Lubarsch¹ a vu aussi les spores, protégées par une enveloppe, se développer en filaments, et celles qui n'étaient pas protégées être saisies par les leucocytes; mais il a vu aussi beaucoup de spores, protégées ou non, ne pas se développer, tout en restant libres dans le suc organique, et des constatations pareilles ont conduit Baumgarten² et ses élèves Petruschky³ et Fahrenholz⁴ à admettre que les globules blancs ne sont pour rien dans le phénomène, qui serait uniquement dû à une propriété du milieu, le rendant impropre au développement des bactéries. Leur

1. *Loc. cit.*, p. 428.

2. L'*experimentum crucis* de la théorie des phagocytes. *Ziegler's Beiträge*, t. VII, p. 1.

3. Recherches sur l'immunité de la grenouille vis-à-vis du charbon. *Diss. Iena*, 1888.

4. Contribution à la critique de la théorie de Metchnikoff sur les phagocytes. *Diss. Königsberg*, 1889.

destruction est due aux liquides de l'organisme, et si elles réussissent à se développer dans une grenouille maintenue à la chaleur, c'est que la lymphe deviendrait à la chaleur plus propre au développement du microbe. L'immunité de la grenouille serait donc une question de nature et de propriétés de la lymphe. Petruschky¹ a vu depuis que les spores renfermées dans des sacs se transforment en filaments, et Rohrschneider², qui est revenu sur l'étude de l'influence de la température sur des grenouilles nourries avec des spores charbonneuses, n'a pas pu décider nettement si les grenouilles succombent aux effets directs de l'ingestion des spores, ou à l'infection partie des muqueuses modifiées par la chaleur.

II

J'ai d'abord repris les expériences de Metchnikoff sur la *Sprosspilzkrankheit* des Daphnies, en profitant de ce que cette maladie est très répandue chez les daphnies du bassin des reptiles au Jardin des Plantes. Il suffit, pour examiner ces animaux, de recouvrir la goutte d'eau qui les contient d'une lamelle de verre, supportée par plusieurs bandelettes de papier huvard, de façon à ne pas comprimer les daphnies, et à leur laisser une certaine mobilité. On réussit ainsi, avec quelques tâtonnements, à trouver l'épaisseur convenable, et les daphnies peuvent rester longtemps vivantes. Il est facile d'y trouver les spores fusiformes du parasite : on en voit en particulier qui ont une moitié encore engagée dans la paroi de l'intestin, et leur autre moitié, extérieure, entourée de nombreux leucocytes. La partie ainsi enveloppée, ou toute la spore, si elle est tout entière saisie, se colore, prend bientôt un aspect irrégulier, rongé, et à la place d'un corps fusiforme, réfringent et blanchâtre, on a une petite masse ronde ou irrégulière, jaune brun, ou même noire. Dans certains cas, la partie attaquée se présente sous forme d'un renflement sphérique, de couleur jaune brun, situé à l'extrémité de la spore ; d'autres fois, elle prend l'aspect d'un corps allongé irrégulier, alternativement dilaté et étranglé. (Pl. X, fig. 1 et 2.)

1. Action du corps de la grenouille vivante sur les bacilles charbonneux, *Zeitschr. f. Hyg.*, 1889, p. 75.

2. *Ziegler's Beiträge*, 1891, t. IX, p. 515.

Les épisodes de la lutte entre la daphnie et son parasite sont faciles à suivre : sur les daphnies vivantes, les spores se multiplient par bourgeonnement, forment une masse de conidies, et la daphnie finit par périr.

Aucun réactif acide ou alcalin ne m'a permis de faire subir aux spores des modifications pareilles à celle que nous venons de voir produites sous l'influence des leucocytes. Il est évident que les cellules vivantes possèdent pour cela des propriétés particulières, qu'il y a vraiment lutte cellulaire, dans laquelle la daphnie succombe quelquefois, et mes observations confirment pleinement celles de Metchnikoff sur le rôle actif que jouent dans cette lutte les cellules amiboïdes de l'animal.

III

S'il y a des cas dans lesquels les spores pathogènes périsse dans l'organisme animal, il y en a aussi, nous l'avons vu, dans lesquelles elles conservent leur vitalité et leur virulence. Que se passe-t-il alors du côté de l'organisme envahi? Laisse-t-il se développer son parasite comme quelques savants le disent? Maintient-il inertes les spores, comme le pensent d'autres? La question a été surtout résolue de façons diverses à propos de la grenouille maintenue à la température ordinaire, et j'ai jugé utile d'en reprendre l'étude expérimentale.

De février à juin 1890 et d'octobre 90 à janvier 91, j'ai injecté à de nombreuses grenouilles, gardées les unes à 16-22°, les autres dans une étuve, aux températures de 25° à 37°,5, des spores charbonneuses pures, provenant de vieilles cultures sur gélose, peptonisée ou non, suivant la méthode de Buchner. Les spores prises telles quelles, ou après un lavage préalable à l'eau stérilisée, étaient injectées dans le sac lymphatique, soit en libre suspension dans l'eau, soit portées sur un fil de soie entouré d'un sac de papier buvard.

La grenouille inoculée, conservée dans un grand bocal où elle avait tout l'air nécessaire, et où elle était à l'abri des variations brusques de température, était ensuite examinée à divers intervalles variant de 30 minutes à plusieurs jours. On prélevait au point d'inoculation, au moyen d'un tube de verre effilé et stéri-

lisé, des gouttelettes de lymphé qui servaient à faire des préparations colorées d'après la méthode de Ziehl, avec une solution de fuchsine dans de l'eau phéniquée, et avec du bleu de méthylène. Avec des solutions fraîches de bonne fuchsine, et si la gouttelette a été bien étalée, on obtient facilement la double coloration. Après un séjour de 12 à 17 heures dans la solution froide de fuchsine, ou de 5 minutes dans la solution presque bouillante, on décolore par l'alcool absolu, quelquefois après un passage dans l'alcool légèrement acidulé, on lave à l'eau et on colore à nouveau avec une solution faible de bleu de méthylène. Pour ne pas provoquer de modifications dans les cellules, je desséchais d'ordinaire à froid ou à l'aide d'un mélange d'alcool et d'éther, au lieu de fixer à chaud.

On voit ainsi que le développement des spores et leur saisie par les leucocytes se font simultanément dans les grenouilles conservées à la température ambiante. Trois quarts d'heure après l'injection, on voit des spores colorées en rouge et les gaines des filaments qu'elles ont abandonnées, et, au voisinage, d'autres spores contenues dans les leucocytes. Au bout de 3 à 6 heures, les leucocytes forment déjà de grands foyers. Au milieu de spores encore rouges, on en trouve de colorées en bleu et leur nombre augmente de plus en plus (pl. X, fig. 3). Plus tard, on voit apparaître des bacilles, et au bout de 48 à 72 heures environ, il y a un grand nombre de filaments, les uns libres (fig. 5), les autres contenus dans les leucocytes, dont quelques-uns sont tellement bondés de bacilles que le noyau de la cellule devient difficile à voir. Il y a aussi, en liberté ou dans les leucocytes (fig. 4, 7), des spores colorées en rouge ou en bleu, et même certains leucocytes contiennent à la fois des spores diversement colorées et des bacilles; ils sont alors sphériques. Quelques-uns, trop remplis, ont évidemment éclaté, et leur contenu apparaît étalé sous forme d'une masse conique située près du noyau coloré. On voit aussi des débris du noyau, sous forme de corpuscules ronds, colorés en bleu. Sur le grand nombre des leucocytes, il n'y en a que quelques-uns ne contenant pas de bacilles ou de spores.

Au début, les bacilles et les filaments, libres ou enfermés dans les leucocytes, se colorent bien en bleu (fig. 6). Plus tard, on en trouve qui prennent mal la couleur, et le fait est plus fréquent

dans les bacilles englobés que dans ceux qui sont restés libres. Peu à peu le nombre de spores et de bacilles libres diminue, celui des éléments englobés augmente.

Au bout de 5 à 6 jours, les spores colorées en bleu deviennent rares; les spores colorées en rouge prédominent dans les leucocytes, qui ne contiennent plus guère de bacilles ni de filaments. Plus tard, ces derniers disparaissent, et on ne trouve plus que des cellules contenant des spores colorées en rouge.

Au bout de 10 à 15 jours, on ne trouve plus que des leucocytes contenant des spores, quelquefois très nombreuses, mais le nombre des leucocytes a diminué, et un grand nombre de cellules ne contient plus de spores. Enfin, après 30 jours, les leucocytes ne sont pas plus nombreux qu'à l'état normal, et on peut admettre que tout est rentré dans l'ordre. Toutefois il arrive de trouver encore des cellules renfermant un grand nombre de spores sur des préparations de lymphé faites de 70 à 100 jours après l'inoculation.

Tout cela témoigne de la lutte qui s'engage de suite entre les leucocytes et les spores. Celles que j'injectais étaient pures, sans bacilles ni filaments, et ce n'est qu'exceptionnellement qu'on y voyait des restes d'anciens filaments ayant donné naissance à des spores. Quelques-unes de ces dernières commencent à se développer aussitôt introduites. Le stade bleu de la spore ou de l'ovoïde court correspond à ce commencement de germination qu'on constate chez les spores libres non englobées par les leucocytes. Mais spores et bâtonnets sont saisis et peu à peu détruits par les leucocytes. Les spores, saisies avant d'avoir eu le temps de se développer, restent intactes dans les leucocytes et se colorent en rouge comme les spores libres. Cette explication est adéquate aux faits, et il n'est nullement nécessaire d'attribuer à l'organisme des propriétés particulières, plus ou moins problématiques.

En résumé, l'organisme de la grenouille, maintenue à la température ordinaire, se prête très bien au développement des spores, qui germent lorsqu'elles sont introduites sous la peau à l'état libre et sans aucune protection contre les leucocytes. On ne peut pas dire alors que la lymphé a été modifiée par la filtration ou la chaleur. Les conclusions de Baumgarten et de ses élèves semblent donc erronées, et si les spores germent quand

on les inocule, entourées d'un sac en papier ou d'une membrane d'intestin (procédé Petruschky), ce fait ne saurait être attribué à ce que la lymphe aurait perdu, par filtration, ses propriétés nocives.

Enfin ces mêmes expériences montrent aussi, contrairement à l'assertion de R. Koch soutenue par Petruschky, que les spores et les bacilles ne se développent pas quand ils ont été saisis par les leucocytes. Les spores et bacilles colorés en bleu augmentent d'abord en nombre, puis sont pris par les cellules, et disparaissent alors successivement à l'extérieur et à l'intérieur des cellules qui, plusieurs jours après l'infection, ne contiennent que des spores rouges inertes, mais encore vivantes, et capables de se développer en dehors des leucocytes, comme nous allons le voir, de sorte qu'il est impossible d'aller chercher ailleurs que dans ces leucocytes les causes du non-développement de ces spores dans l'organisme.

IV

Nous avons vu le nombre des leucocytes augmenter progressivement au voisinage du point d'inoculation et, en même temps, le nombre des spores y diminuer de plus en plus. D'autre part, on sait que les spores sont portées en différents points de l'organisme. Il semble donc naturel d'attribuer, pour une grande part, ce transport aux leucocytes¹, et les faits suivants montrent que cette idée est juste.

1. Il est évident que les spores peuvent être transportées, chez les mammifères, dans le ganglion voisin du point de l'inoculation sous-cutanée, comme cela a dû se passer dans les expériences de *M. Phisalix*, rapportées dans les *Archives de médecine expériment.* (1891, n° 1, p. 189.) D'après ce savant, la stérilité du sang et de la rate de ses animaux d'expérience, alors que les cultures du ganglion sont fécondées, sont « des faits extraordinaires, surtout si on les envisage sous l'influence des idées courantes relativement au rôle des leucocytes » (*l. c.*, p. 161). Nous considérons, au contraire, comme tout à fait naturel qu'un organe qui renferme des germes, transportés dans son intérieur, et aussi résistants que les spores charbonneuses, donne, ensemencé dans du bouillon, une culture de bactéries. Nous avons observé des phénomènes analogues après l'introduction de spores dans le sang ou dans le sac lymphatique, d'où elles ont été emportées dans différents organes. Nous ne pouvons seulement accepter l'opinion de *M. Phisalix*, qui attribue au charbon la mort des animaux ayant succombé longtemps après avoir été inoculés, et dont, seul, le ganglion voisin du point d'inoculation donnait à l'ensemencement un développement de bactéries. *M. Phisalix* n'a fourni aucune preuve que, dans ces cas, il ne s'agissait pas seulement d'une mort accidentelle de ses animaux inoculés, dont le ganglion pouvait naturellement conserver des germes vivants.

Sur une grenouille morte 21 jours après l'inoculation, j'ai trouvé des spores dans les macrophages du foie et dans les leucocytes de la rate ; quelques-unes de ces cellules contenaient 12 à 15 spores et même davantage. Sur deux autres grenouilles, tuées l'une 78 jours, et l'autre 79 après l'infection, on trouva également des spores dans les cellules du foie et de la rate. En présence de ces faits, en voici d'autres qui montrent que des spores saisies vivantes par des leucocytes conservent longtemps leur vitalité et leur virulence.

Toutes les expériences suivantes ont été faites en inoculant sous la peau, avec des spores charbonneuses, des grenouilles qu'on conservait à la température de la chambre ; on soumettait à diverses époques le contenu du sac lymphatique de ces grenouilles ou de leurs organes à des examens variés.

A. Des spores restent vivantes après 17 jours passés dans l'intérieur des leucocytes. Pour le montrer, j'ai additionné d'un peu de bouillon une goutte de lymphé, et j'ai fait avec ce mélange des gouttes suspendues, que je mettais en chambre humide, dans un thermostat à 35° 5, après m'être assuré qu'il n'y avait dans la goutte ni bacilles ni filaments, et seulement des leucocytes dont quelques-uns contenaient un grand nombre de spores. Au bout d'une heure, on voyait quelques leucocytes devenus sphériques, pendant que d'autres avaient conservé leur mobilité. Après 3 heures, on trouvait dans les gouttes des bacilles et des filaments, ce qui démontrait que le développement et la transformation des spores avaient débuté dans les cellules. En faisant avec la goutte des préparations desséchées, et colorées avec la fuchsine et le bleu de méthylène, on voyait des bacilles développés dans les cellules, des filaments encore contenus à moitié dans la cellule, des spores non développées sans qu'on puisse dire pour quelles causes, et des bacilles en dehors des leucocytes.

B. Des spores restent vivantes après un long séjour dans l'organisme de la grenouille. Pour le montrer il suffit d'ensemencer, à diverses époques après le moment de l'infection, la lymphé ou le suc de divers organes de la grenouille sur gélatine ou sur gélose dans les soucoupes de Petri, et d'y surveiller le développement du *B. anthracis*. Voici le résumé de mes expériences.

N° de l'expérience	Nombre de jours écoulés depuis l'inoculation	Température à laquelle la grenouille a été maintenue	ORGANES ENSEMBLÉS					OBSERVATION
			lymphé	poumon	foie	rate	reins	
1	24	14 à 20°	0	0	+	+	0	tuee
2	27	"	+	+	+	+	+	"
3	55	14 à 23°	0	+	+	+	+	morte
4	60	"	?	?	?	+	?	tuee
5	62	14 à 26°	0	+	+	+	0	"
6	66	"	0	+	+	+	+	"
7	77	"	—	—	+	+	+	"
8	39	15 à 20°	+	+	+	+	+	morte
9	78	12 à 22°	—	+	+	+	+	tuee
10	79	"	—	+	+	+	?	"
11	70	"	—	+	+	+	+	"
12	100	"	+	+	+	+	+	"

Ainsi, après 100 jours, il y a encore des spores vivantes dans la lymphé et les organes.

C. *Les spores restées vivantes ont aussi conservé leur virulence.* Pour le montrer, il suffit de faire des cultures sur gélose avec les colonies obtenues dans les soucoupes de Petri, et d'inoculer des cobayes et souris blanches, qui meurent dans les délais habituels, comme le montrent les expériences suivantes, dont les numéros se rapportent aux chiffres du tableau précédent.

Exp. 1 Deux cobayes inoculés sont morts en 44 à 46 heures.
 — 9 Une souris blanche inoculée est morte en 22 —
 — 10 — — 20 —
 — 12 — 36 à 40 —

La virulence peut donc persister au moins 100 jours, et peut-être davantage, dans les organes d'une grenouille maintenue à l'abstinence dans un bocal à la température de la chambre. Peut-être les spores périraient-elles plus vite chez une grenouille conservée dans les conditions normales, mais leur disparition serait sans doute lente; et le seul rôle que nous trouvions aux leucocytes, du moins dans nos expériences, est d'empêcher le développement des spores charbonneuses, mais non de les tuer.

D. *Les spores ne subissent aucune action nocive de la part des sels organiques de la grenouille, et s'y développent dès la destruction*

des cellules qui les ont saisis. Pour le démontrer, il m'a suffi de recommencer les expériences du § A avec de la lymphe pure, prise dans le sac lymphatique du dos des grenouilles infectées. Cette lymphe prélevée 15 jours après l'inoculation, et mise en gouttes suspendues, a passé par les mêmes stades de développement que le mélange de lymphe et de bouillon du § A. On y voyait très nettement des spores se transformer en bacilles pendant que d'autres restaient inertes. Après 3 heures de séjour dans le thermostat, on voit déjà les premiers signes de la germination des spores. Après 5 heures, on voyait apparaître des filaments, qui, au bout de 20 heures, formaient un feutrage épais. J'ai retrouvé les mêmes résultats avec de la lymphe puisée 26, 70, 77 et 100 jours après le moment de l'infection. Il reste donc démontré que ce n'est pas la lymphe, mais le leucocyte qui empêche les spores de germer, puisque le leucocyte mort, les spores qu'il contenait se développent dans la lymphe. Ceci confirme évidemment l'absence de propriétés bactéricides dans la lymphe de la grenouille.

V

Nous venons de voir que chez les grenouilles conservées à la température de la chambre, les leucocytes arrêtent, tant qu'ils restent vivants, le développement des spores ; s'ils meurent, ces spores se développent ; mais, sur l'animal vivant, les bacilles qu'elles fournissent sont saisis par d'autres leucocytes, et, à la condition que cette mort des leucocytes, qui survient aussi sur l'animal vivant, et que cette mise en liberté des spores, qui en est la conséquence, ne se fassent que progressivement et avec lenteur, l'organisme peut arriver à détruire tous ses parasites sans subir d'atteinte bien sensible. Mais il est clair que si nous diminuons par un moyen quelconque l'énergie et l'activité des leucocytes, l'animal pourra succomber. C'est précisément à quoi on arrive en conservant les grenouilles à des températures élevées, entre 34° et 37°.

On trouve alors, en employant le même mode d'observation que tout à l'heure, que les spores sont encore saisies par les leucocytes, mais que ces derniers arrivent moins nombreux ; la

phagocytose est faible; les spores donnent des bacilles, et l'animal succombe. Pourtant, sur les préparations colorées, on trouve un grand nombre de cellules contenant des spores teintées en rouge et non développées. Ceci prouve qu'il y a encore une lutte, mais une lutte plus inégale, et dont les bacilles sortent vainqueurs.

Lubarsch (*l. c.*) a vu que les grenouilles habituées à des températures élevées supportent aussi bien l'infection charbonneuse que les grenouilles ordinaires. J'ai vu de mon côté que celles-ci, infectées de spores charbonneuses et gardées à la température de la chambre, peuvent dans certains cas, rares il est vrai, ne pas succomber au charbon quand on les met dans une étuve à 34-37°, et vivre longtemps dans ces conditions.

Le 13 mars 1890, on met dans l'étuve une grenouille infectée depuis 19 jours par des spores charbonneuses, et on l'y laisse 11 jours. La grenouille, notamment affaiblie par ce séjour, est retirée, et 42 jours plus tard, c'est-à-dire 72 jours après la première infection, elle est de nouveau inoculée avec des spores charbonneuses et remise dans l'étuve à 37°.

L'examen microscopique des préparations de la lymphe, prise quatre heures plus tard, a démontré la présence de bacilles, de longs filaments libres et de spores colorées en rouge. Les cellules renfermaient également un grand nombre de bacilles, de filaments et de spores. La grenouille a succombé après 24 heures d'étuve, avec hypertrophie de la rate et du foie; ce dernier était jaune pâle et atteint de dégénérescence graisseuse. La lymphe et les organes contenaient beaucoup de bacilles et ont donné des ensemencements féconds.

Voici un autre exemple. Le 22 octobre 1890, une série de grenouilles maintenues à 16° es inoculée avec des spores charbonneuses provenant d'une culture fraîche sur gélose.

Dans la lymphe prise sur une grenouille¹ 30 minutes après l'infection, on trouvait déjà des spores dans des cellules, et leur nombre était grand après 33 heures. 62 jours après l'infection, on met pendant 5 heures cette grenouille à l'étuve à 35°, après quoi on la porte à l'étuve à 40-41°. Retirée presque

1. L'infection avait eu lieu en introduisant un grand nombre de spores dans le sac lymphatique dorsal.

sans signe de vie après 10 minutes à cette température, elle revient dans l'eau froide, où elle reste pendant 26 jours à la température ordinaire. On la remet le 19 janvier 1891 dans l'étuve à 36°-37°, où elle reste 6 jours. A ce moment, c'est-à-dire 94 jours après l'infection, on trouvait, dans la lymphe du sac dorsal, des cellules renfermant des spores : beaucoup en contenaient de 15 à 20. D'autres contenaient aussi des bacilles faiblement colorés en bleu et évidemment dégénérés. Par places, des bacilles libres et des filaments courts. Il est clair que quelques spores ont pu germer et donner des bâtonnets qui ont été saisis par les leucocytes.

Une goutte de lymphe semée sur gélose, d'autres mises en gouttes suspendues, ont donné partout des développements abondants, et une souris, inoculée avec ces cultures, est morte du charbon en moins de 36 heures. Les spores n'avaient donc perdu ni leur vitalité ni leur virulence après 94 jours passés dans les cellules de la grenouille.

Cette grenouille a encore été laissée 14 jours à l'étuve, soit en tout 21 jours, et le 9 février 1891, elle a reçu sous la peau un grand nombre de spores provenant d'une culture sur gélose datant du 4 mars 1890, restées longtemps dans de l'eau stérilisée, et par conséquent ne contenant pas de bacilles.

18 heures après, des préparations colorées de la lymphe montrent une accumulation considérable de leucocytes, dont beaucoup renferment de grandes quantités de spores rouges et bleues, de bacilles et de filaments (voir photogrammes 2 et 3, pl. XI). Quelques-uns, bondés de spores, principalement de spores rouges, ont pris une forme sphérique. Le nombre de spores libres et de bacilles n'était pas grand, mais on rencontrait de longs filaments libres, bien colorés en bleu.

Après 48 heures, les différences étaient déjà très accusées. Les préparations ne montraient presque plus de bacilles et de filaments libres, et bien qu'on rencontrât des leucocytes contenant, à côté des spores, des bacilles et des filaments, le nombre de ces derniers était faible. Les leucocytes contenant des spores rouges prédominaient dans toutes les préparations. Par places, on trouvait des macrophages ayant absorbé, d'une part des microphages avec leur contenu, et d'autre part des spores isolées (voir fig. 8). Les bacilles et les filaments renfermés dans les

cellules étaient dégénérés et se coloraient mal. Le nombre des bacilles et des filaments semblait plus grand que dans les préparations précédentes:

Sur les préparations faites 71 heures après l'injection, on ne trouvait plus de bacilles ni de filaments libres; les spores libres étaient aussi rares. Les cellules étaient remplies de spores rouges et, par places seulement, on en trouvait qui renfermaient des restes de filaments faiblement colorés. L'accumulation des leucocytes semble toujours très grande, et la grenouille a encore un bon aspect.

Sur les préparations de lymphé prélevée 9 jours après la seconde infection, la grenouille restant toujours dans l'étuve, on trouvait déjà peu de leucocytes, dont un petit nombre seulement contenait des spores rouges. Nulle part de spores ou de bacilles libres.

Le 22 février 1891, la grenouille est retirée de l'étuve, où elle est restée 33 jours; elle est toujours très vigoureuse. Elle est donc restée vivante 120 jours après l'infection.

Ces expériences montrent qu'une première infection ne rend pas l'animal impropre au développement du microbe inoculé à nouveau. Elles contredisent la théorie dite de l'épuisement, et les conclusions de MM. Baumgarten, Petruschky, Fahrenholtz et autres partisans de cette théorie. Elles confirment les recherches de Lubarsch qui, par une série d'expériences sur les lapins et les cobayes, a démontré l'inexactitude de la théorie précédente¹.

Nous venons de voir que sur cette grenouille soumise à deux infections successives, et malgré le grand nombre de spores introduit à chaque fois, les spores ayant germé disparaissaient très vite, de sorte qu'elles devenaient très rares après 48 heures. En ne faisant l'examen que 48 ou 60 heures après l'infection, on n'aurait trouvé que des spores renfermées dans les cellules, de sorte qu'on aurait pu conclure que leur développement ou ne se produit pas, ou ne fait que commencer, alors qu'en réalité le processus est déjà fini. C'est là ce qui me semble expliquer comment M. Lubarsch a pu dire que chez certaines grenouilles

1. Une autre grenouille de la même série a été mise, 84 jours après l'infection, dans une étuve à 34-37°, d'où elle est sortie, au bout de 6 jours, encore très vigoureuse. Elle a vécu encore quelque temps, puis a succombé à une cause accidentelle.

mises à l'étuve à 28-31°, les spores ne sont pas encore développées au bout de 48 heures.

D'un autre côté, aux températures basses, de 12° à 14°, le développement des spores est plus lent, et elles sont saisies par les leucocytes avant de l'avoir commencé, ou de l'avoir poussé au delà de ses premières phases. Ceci peut laisser croire que les spores ne se développent pas dans la lymphe à la température ordinaire. Comme M. Fahrenholtz faisait ses premières préparations 4 jours après l'infection, et même plus tard, on comprend qu'il a dû ne pas observer de développement des spores.

Je me suis assuré, dans deux séries d'expériences conduites de tous points d'une façon comparative, que les spores se comportent exactement de la même façon avec la *Rana esculenta* et la *Rana temporaria*.

Mes expériences démontrant que les spores charbonneuses se développent à la température ordinaire dans le sac dorsal de la grenouille lorsqu'elles ne sont pas défendues contre les leucocytes, j'ai cru utile de répéter les expériences dans lesquelles on les inocule après les avoir protégées par une membrane d'intestin ou un sac en papier. Pour tenir compte de l'opinion de M. Baumgarten et de ses élèves, j'ai introduit sous la peau de la grenouille des fils chargés de spores, et entourés d'un sac en papier buvard. J'ai toujours vu ces spores se transformer en longs filaments, tandis que celles que j'inoculais en même temps et sans protection sous la peau étaient saisies par les leucocytes avant germination ou aux premières phases de leur développement. Dans ce dernier cas, il n'y avait pas de longs filaments, et le nombre des bacilles était beaucoup plus faible que dans les sacs en papier buvard. On trouvait en même temps, tant dans le sac qu'en dehors, des spores libres non développées, quoique jamais en nombre aussi grand que le dit Lubarsch, mais on en trouve aussi qui restent inertes quand on les sème sur un milieu nutritif à basse température. Dans le corps de la grenouille, la basse température n'empêche pas la phagocytose, et une fois les spores saisies par les leucocytes, elles ne pourront plus germer, même quand on les placera dans des conditions favorables à leur développement. Ces expériences contredisent donc d'une façon décisive les déductions de MM. Baumgarten et de ses élèves, déductions basées sur des expériences analogues.

VI

POULES. — On sait que les poules jouissent, vis-à-vis du charbon, d'une immunité naturelle très marquée, qu'on peut pourtant faire disparaître par divers procédés : réfrigération (Pasteur), inanition (Canalis et Morpurgo). Pour savoir ce que devenaient les spores inoculées à ces animaux, j'ai opéré sur des poules vigoureuses et maintenues dans leurs conditions de vie normales.

Pour éviter le transport des spores loin du point d'inoculation, j'opérais de la façon suivante. Après avoir lavé au sublimé la région de la peau où l'infection allait être faite, je préparais, avec une aiguille lancéolée, sous la peau de la poule, une sorte de poche, où j'introduisais, à l'aide d'un tube effilé, des amas de spores provenant directement d'une culture sur gélose, ou lavées au préalable dans l'eau distillée. L'orifice extérieur de la poche était ensuite fermé avec du collodion, et le point d'inoculation marqué au crayon. On pouvait ainsi le retrouver sûrement, et aller y puiser des matériaux pour l'étude. Il serait difficile à retrouver sans ces précautions, car il ne s'y produit guère de pus ni d'œdème, et beaucoup d'insuccès n'ont pas d'autre explication que des erreurs provenant de ce chef.

En faisant, avec la lymphe prise au point d'inoculation 3 à 4 heures après l'infection, des préparations colorées à la fuchsine et au bleu de méthylène, on y trouve une accumulation de leucocytes dont beaucoup sont littéralement bondés de spores rouges (pl. X, fig. 9), deviennent sphériques, et ne sont reconnaissables que grâce à leur noyau fortement coloré en bleu. En outre, dans quelques cellules, à côté des spores rouges, on trouvait des spores bleues, des bacilles et des filaments courts (voir fig. 10). On voyait en même temps, en dehors des cellules, un assez grand nombre de spores libres, rouges, plus rarement bleues, des bacilles et des filaments. On pouvait donc suivre toutes les phases du développement de la spore jusqu'au filament.

Sur des préparations faites 17 heures après l'infection (et provenant d'une autre poule), on voyait un petit nombre de filaments courts à 5 ou 6 articulations: filaments minces et filaments épais contenant des gaines ou des restes d'anciennes gaines

abandonnées par les spores. On trouvait en plus des spores libres et un grand nombre de leucocytes renfermant des spores rouges. Tous ces éléments étaient bien colorés.

Sur les préparations faites 44 heures après l'infection, le nombre des spores libres a notablement diminué; les bacilles et les filaments sont devenus rares, mais on trouve toujours des leucocytes renfermant des spores.

Au bout de ce temps, il devenait impossible de retirer de la lymphe du point d'inoculation. Ce dernier se dessèche, l'œdème et la suppuration disparaissent, et, au bout de quelques jours, on ne retrouve plus ni bacilles ni filaments.

Quand on fait l'inoculation dans la crête ou les caroncules, la région se tuméfie et devient œdémateuse, mais il n'est pas facile d'y trouver les cellules remplies de spores, qui sont rapidement emportées loin du point d'inoculation.

Quoi qu'il en soit, on voit que bien que les spores se développent dans l'organisme de la poule, celle-ci n'en paraît pas moins bien portante, mais elle est en réalité atteinte par l'infection charbonneuse, car à l'autopsie de poules tuées deux mois à deux mois et demi après l'infection, je trouvais l'intestin noyé dans une masse de graisse, le foie hypertrophié, pâle, jaunâtre, ayant aussi subi la dégénérescence graisseuse, et, au niveau du cœur, des dépôts considérables de graisse.

Pour savoir combien de temps les spores du charbon conservent dans l'organisme de la poule leur vitalité et leur virulence, j'ai fait les expériences suivantes. J'ai réfrigéré des poules infectées depuis plus ou moins longtemps, en les mettant dans des filets plongeant dans de l'eau à 25°. Le ventre seul de la poule était immergé, le reste du corps était sec. La durée du bain a été de 24 à 27 heures. Dans quelques cas, on a changé 2 ou 3 fois l'eau du bain, jusqu'à ce que la poule tombât dans un état comateux : on arrive ainsi à faire tomber à 26° la température initiale, qui est de 40°,5 — 42,1.

Sur six poules dont la réfrigération a ainsi commencé de 3 à 6 jours après l'infection, deux seulement ont succombé au charbon. Les poules réfrigérées 14, 16, 18 et 30 jours après l'infection ne sont pas mortes charbonneuses, bien que le nombre des spores introduites fût considérable, la réfrigération intense et l'affaiblissement des animaux excessif.

Dans un cas, l'expérience a été faite sur un grand coq vigoureux qui a supporté, trois jours après l'infection, un bain de 24 heures sans paraître en souffrir, et en conservant une température de 40°. Après un second bain de 47 heures, donné presque immédiatement après le premier, la température tomba à 38°.5; mais le coq était encore en bon état, mangeait bien, et ce n'est qu'après un 3^e bain de 25 heures que la température tomba à 28°, et que l'œdème parut au point d'inoculation, qui était la caroncule. Sur les préparations faites avec des parties prises à ce niveau, on trouva des bacilles et un grand nombre de filaments courts. Le coq fut alors mis dans une étuve à 36°, mais sa température alla en s'abaissant de plus en plus, et l'animal mourut du charbon. Le sang et les organes contenaient un grand nombre de bactéries.

Les spores ont donc conservé pendant six jours, dans l'organisme de ce coq, leur vitalité et leur virulence. Nous avons vu plus haut qu'elles les perdaient au bout de 14 jours. Comme nous avons vu que dans la poule non refroidie, elles pouvaient se développer au début, et qu'elles y étaient saisies par les leucocytes, il est évident que c'est aussi à ces leucocytes qu'il faut attribuer leur non-développement, même dans les poules refroidies, et peut-être leur destruction. On peut donc conclure de ces faits que l'immunité des poules contre le bacille du charbon dépend en grande partie de l'action des cellules. Il suffit, comme chez les grenouilles, d'affaiblir l'énergie des leucocytes, de paralyser leur action sur les spores saisies, et aussitôt celles-ci provoqueront la mort de l'animal.

Ces expériences confirment l'opinion de Pasteur et les conclusions de Wagner¹ relatives au rôle des phagocytes. Par contre, elles contredisent formellement l'opinion de M. Netchaïeff², d'après lequel les leucocytes des oiseaux saisissent très rarement les bacilles, surtout chez la poule, dont les leucocytes, dit-il, sont si petits comparativement aux bacilles, que la phagocytose y est exceptionnelle.

PIGEONS. — Les savants ne sont pas d'accord au sujet de l'immunité des pigeons contre le charbon. Les uns (Czaplewsky,

1. *Ces Annales*, t. IV, p. 570.

2. Le rôle des leucocytes dans l'infection par les bactéries. *Diss. inaug.*, Moscou, 1890, pp. 76 et 78.

Netchaïeff) la considèrent comme absolue, les autres (Straus, Metchnikoff, Emler) comme relative. Dans les expériences de Canalis et Morpurgo, deux pigeons seulement ont péri du charbon sur 12 inoculés; dans les expériences de Kitt, 2 sur 17. Pour M. Savtchenko¹, le pigeon adulte est absolument réfractaire vis-à-vis de cultures faites en dehors de l'organisme, mais peut céder à des cultures ayant passé par l'organisme affaibli d'un autre pigeon. Mes expériences ont porté sur 3 pigeons, dont deux se sont montrés réfractaires vis-à-vis d'inoculations répétées : le troisième, un jeune pigeon, a succombé au charbon, 7 jours après l'infection par des spores.

Quand on introduit sous la peau d'un pigeon un fil chargé de spores, ou des spores libres prises directement sur les cultures ou après un séjour préalable dans l'eau, on voit les phénomènes suivants.

Sur les préparations faites 4 heures après l'introduction des spores dans le tissu cellulaire sous-cutané du thorax ou des pieds, on trouve une accumulation considérable de leucocytes, et un grand nombre de cellules renfermant des spores colorées en rouge, enfin d'autres contenant, à côté de spores rouges très nombreuses, des spores bleues, des bacilles et des filaments. En dehors des cellules, on rencontre également des spores rouges en grand nombre, et plus rarement des spores bleues, des bacilles et des filaments assez longs.

Au bout de 24 heures, le nombre de filaments et bacilles libres a notablement diminué; par places, on trouve des cellules littéralement bondées de spores rouges. Les filaments et les bacilles sont bien colorés en bleu. Plus tard le sort des spores est le même que chez les poules.

Chez le pigeon qui a succombé au charbon, on trouvait encore, 23 heures après l'introduction du fil chargé de spores, un petit nombre de leucocytes contenant des spores, mais l'accumulation des leucocytes était faible. On voyait également des spores libres, des filaments à 4 ou 5 articles, quelquefois plus longs jusqu'à 10 articles.

Plus tard il s'est formé au point d'inoculation de la tumé-

1. Contribution à l'étude de l'immunité contre le charbon. *Centralbl. f. Bact.*, 1891.

faction et de l'œdème; à l'autopsie on trouva une hypertrophie considérable du foie et de la rate. Le sang et les organes donnaient des bacilles du charbon.

Ces expériences montrent que chez le pigeon jouissant de l'immunité, les spores du charbon se développent, et qu'un grand nombre de spores, transformées ou non, de bacilles et de filaments est saisi par les leucocytes. Chez le pigeon qui a succombé au charbon, il existait également une accumulation de leucocytes, mais cette dernière était faible. Metchnikoff¹ et Hess² ont insisté dans leurs travaux sur l'importance de la phagocytose au point de vue de l'immunité du pigeon, et le premier de ces auteurs a constaté le développement des spores du charbon dans la chambre antérieure de l'œil et sous la peau des pigeons. Savtchenko (*l. c.*) admet que la section de la moelle épinière rend le pigeon apte à l'infection charbonneuse. Netchaïeff est d'avis que ce n'est qu'exceptionnellement qu'on trouve des bactéries dans les leucocytes chez le pigeon, et Czaplewsky va encore plus loin en niant toute influence des cellules sur l'immunité du pigeon. Lubarsch a constaté le développement des spores dans l'organisme des pigeons (*l. c.*, p. 103).

Canalis et Morpurgo (*l. c.*) rendaient les pigeons aptes à contracter le charbon en les soumettant à l'inanition; mais si les pigeons infectés étaient bien nourris avant d'être soumis à l'inanition, ils succombaient aux résultats de l'inanition, mais non pas au charbon. Ils ont en même temps constaté que les spores du charbon conservent pendant longtemps leur vitalité et leur virulence.

Mes expériences confirment les observations de Metchnikoff et Hess, et contredisent les conclusions de Czaplewsky et Netchaïeff. Le développement des spores dans l'organisme du pigeon réfractaire, et leur transformation consécutive en bacilles et filaments longs, montrent d'une façon très nette que, contrairement à l'avis de M. Savtchenko, l'organisme du pigeon ne présente nullement un milieu impropre ou non favorable au développement des bactéries charbonneuses.

RATS GRIS. Le rat gris étant considéré par quelques savants

1. *Annates de l'Inst. Pasteur*, t. IV, n° 2, 1890.

2. *Virchow's Arch.*, 1887, t. CIX, p. 379, 380.

comme absolument réfractaire au charbon, j'avais projeté sur lui une série d'expériences que j'ai été obligé de réduire à une seule. J'ai introduit dans la chambre antérieure de l'œil d'un rat gris, des spores charbonneuses provenant d'une culture et restées six mois dans l'eau distillée.

Dans le liquide pris dans l'œil malade 17 heures après l'inoculation, on trouvait un petit nombre de spores rouges libres, et beaucoup de bacilles courts, gros, avec la gaine colorée, et de bacilles minces, à gaine transparente et incolore. Les cellules étaient rares.

Après 24 heures, l'aspect était le même, mais le nombre des filaments avait augmenté. Le rat était très faible et a succombé au charbon moins de 36 heures après l'infection. Les spores du charbon se développent donc, même dans un organisme réputé réfractaire, et ceci confirme les expériences de Savtchenko qui voit périr les rats gris adultes inoculés avec des cultures rendues virulentes par passage au travers de l'organisme d'un rat gris jeune.

En résumé, chez tous les animaux qui m'ont servi pour mes expériences, et qui jouissent d'une immunité naturelle, les spores se développaient et se transformaient en bacilles et en filaments, qui quelquefois amenaient la mort de l'animal inoculé. L'organisme de ces animaux ne constitue donc nullement un milieu impropre au développement des bacilles charbonneux. Aussi est-il impossible d'accepter l'opinion de quelques savants (Lubarsch) qui ne reconnaissent pour réfractaires que les animaux dans lesquels le développement des spores n'a jamais lieu. Il n'y aurait pas alors d'animaux vertébrés jouissant de l'immunité contre le charbon.

VIII

Parmi les animaux jouissant d'une immunité artificielle, j'ai pris le lapin pour y étudier le sort des spores : j'ai choisi des animaux ¹ ayant résisté à des infections multipliées avec des

1. Un de mes lapins, donné par M. le Dr Malm, a résisté aux injections suivantes : 1^o 24 janvier 1890 : inoculation du 1^{er} vaccin charbonneux; 2^o 30 janvier : 2^e inoculation du même vaccin; 3^o 7 février : inoculation du second vaccin; 4^o 21 février : inoculation d'une culture virulente ayant tué un cobaye en 36 heures et un lapin en 80 heures; 5^o 4 mars : introduction de 2 fils chargés de spores de charbon ayant

cultures charbonneuses très virulentes, et dont l'état réfractaire était par conséquent hors de doute.

Vingt ou 24 heures après l'introduction sous la peau d'une culture ne contenant que des spores charbonneuses, on voit apparaître au point d'inoculation de la rougeur, une tuméfaction ressemblant à un abcès rempli de pus épais : les vaisseaux voisins sont dilatés, mais le lapin semble se bien porter.

Sur des préparations faites 3 ou 4 heures après l'infection, on voit une accumulation considérable de leucocytes, des spores libres et colorées en rouge dans la lymphe, un petit nombre de spores bleues, des bacilles et des filaments. Après 24 heures, on trouvait toujours des leucocytes, dont quelques-uns contenaient en grand nombre des spores rouges. Les spores libres étaient rares, mais, par places, on trouvait encore des groupes de spores libres au milieu desquelles on voyait des bacilles. Un grand nombre de cellules ne contenaient pas de spores. Les spores bleues paraissaient dans certains cas tuméfiées, et présentaient une capsule distincte (tuméfaction de l'endo-sporium.)

Au bout de 48 heures, on trouve encore des cellules, quelquefois en grand nombre, renfermant des spores rouges. Les spores bleues et les bacilles ne se rencontrent plus sur toutes les préparations.

Il résulte de là que, chez le lapin jouissant de l'immunité, il se fait une germination des spores, mais ce développement est faible, peu marqué et plus difficile à observer que chez les grenouilles. Si les spores sont introduites profondément sous la peau, elles sont rapidement emportées et deviennent difficiles à trouver, même au point d'inoculation. Si elles sont introduites dans une sorte de petite poche creusée dans le tissu cellulaire sous-cutané du lapin, elles restent plus longtemps au point d'inoculation, et il est plus facile de suivre leur développement et leur transformation.

tué un lapin en 50 heures ; *6^e mars*: inoculation sous-cutanée d'une certaine quantité de sang de chien mort du charbon le même jour. Ce sang a tué un cobaye et un chien en 30 heures ; *7^e 1^{er} avril*: injection dans la veine de 0,5 c.c. de sang d'un chien mort du charbon; un lapin inoculé avec ce sang meurt en 8 heures ; *8^e 4 avril*: inoculation sous la peau d'une culture fraîche provenant du sang d'un chien mort du charbon.

IX

Pour étudier les phénomènes locaux qui accompagnent l'introduction des spores pathogènes dans l'organisme des animaux non réfractaires, et pour voir s'il existe une réaction, une lutte de l'organisme contre elles, j'ai fait un certain nombre d'essais sur des lapins et des cobayes.

Comme dans les expériences précédentes, je me suis servi de spores charbonneuses, que j'introduisais sous la peau de l'oreille des animaux. Ici il ne pouvait y avoir de doute sur la question de savoir si les spores se développent, si les milieux de l'organisme ont, ou non, des propriétés bactéricides. La mort de l'animal, survenant régulièrement après l'infection, répondait à ces questions, mais ce qui était intéressant, c'était de savoir comment les éléments cellulaires de ces animaux se comportaient à l'égard des spores.

Quatre heures après l'injection, on voyait chez le lapin apparaître, au point d'inoculation, une légère hypérémie et une tuméfaction à peine appréciable, de sorte que la réaction inflammatoire locale paraissait à peine exister. Sur les préparations de lymphé, on voyait un grand nombre de spores non germées et colorées en rouge, des bacilles et des filaments à 2-5 articles, peu nombreux ; les leucocytes n'étaient guère plus nombreux, mais quelques-uns renfermaient déjà plusieurs spores et bacilles ; par place on trouvait des leucocytes renfermant un grand nombre de spores.

Au bout de 26 heures, on trouve toujours un grand nombre de spores rouges et des filaments libres, mais les leucocytes restent en petit nombre. Au bout de 45 heures, on ne trouvait plus, sur certaines préparations, ni bacilles ni spores, et le nombre des cellules avait encore notablement diminué.

L'animal a succombé au charbon 84 heures après l'infection.

Nuttall (*l. c.*) qui injectait sous la peau des lapins des cultures de charbon renfermant des spores, observait 20, 30 et 45 heures après l'infection les phénomènes suivants : œdème suivi de suppuration au point d'inoculation, grand nombre de bacilles et filaments libres, leucocytes peu nombreux, et phénomènes

de phagocytose très rares. Au début on voyait des bacilles bien colorés qui dégénéraient plus tard, bien qu'ils fussent libres et situés en dehors des leucocytes.

Dans un autre cas, il a vu se former, 20 heures après l'infection, un exsudat riche en leucocytes dont quelques-uns renfermaient des bacilles dégénérés. Au bout de 30 heures, il y avait un grand nombre de bacilles normaux, et peu de leucocytes; ces derniers ne contenaient plus de bacilles. L'animal a succombé au charbon 48 à 50 heures après l'infection.

Sur des préparations de lymphe prise au point d' inoculation après la mort de l'animal, et provenant d'un de nos lapins mort 48 heures après l'infection (injection des spores sous la peau de l'oreille), on voyait des spores rouges contenues dans des leucocytes, et un petit nombre de bacilles.

On voit donc que chez les animaux non réfractaires, les spores et les bacilles du charbon sont saisis par les leucocytes; seulement, la phagocytose chez ces animaux étant peu intense, les spores ont le temps de germer, de se transformer en bacilles, et finissent par tuer l'animal. L'organisme de ces animaux lutte contre l'infection, mais la lutte est faible et se termine au profit des agents infectieux.

Chez les cobayes inoculés sous la peau avec des spores du charbon, on observe les mêmes phénomènes que chez les lapins.

En introduisant sous la peau d'une patte une certaine quantité de spores provenant d'une culture sur gélose, délayée dans une petite quantité d'eau, et un fil chargé de spores sous la peau de l'autre patte, on voyait déjà, sur les préparations faites 3 heures après l'injection, et colorées à la fuchsine et au bleu de méthylène, un grand nombre de spores libres colorées très nettement en rouge, des bacilles et des filaments à 3-5 articles. Les leucocytes n'étaient pas nombreux, mais un grand nombre d'entre eux renfermaient des spores, quelquefois en quantité considérable; les bacilles étaient rares dans les cellules.

Au bout de 24 heures, le tableau est notablement changé : sur les préparations, on trouve un nombre considérable de bacilles, de filaments longs ou courts; par place on rencontre des spores bleues ou rouges, dont le nombre a notablement diminué. Les leucocytes, peu nombreux et ordinairement à plusieurs noyaux, renferment des bacilles et des spores rouges. On

voit que la plupart des spores a eu le temps de se développer et de se transformer, de sorte que la lutte devient impossible pour le petit nombre de leucocytes. 36 à 40 heures après l'infection, le cobaye fut trouvé mort.

Le sang et les organes de l'animal contenaient des bacilles ; dans le liquide de l'œdème développé au point d'inoculation des spores, on a trouvé des bacilles et des filaments courts. Sur les préparations faites avec le point où fut introduit le fil chargé de spores, à côté des filaments libres, on trouvait encore des spores rouges libres et des leucocytes renfermant un grand nombre de spores. Ce dernier fait prouve qu'un certain nombre de spores ne germent pas, non seulement dans l'organisme des animaux jouissant de l'immunité, mais aussi dans celui des animaux non réfractaires. Comme chez les lapins, l'organisme du cobaye réagit aussi contre l'infection : il y a lutte entre l'organisme et les microbes pathogènes, mais cette lutte n'est pas énergique et la victoire reste aux agents infectieux ; l'animal succombe. Chez les animaux non réfractaires, on n'observe pas une accumulation aussi grande de leucocytes, et une phagocytose aussi intense que chez les animaux jouissant de l'immunité.

Malgré la sensibilité excessive des lapins envers le charbon, qui les tue très rapidement, Peckelharing affirme, en se basant sur ses expériences d'introduction de spores charbonneuses entourées d'un sac de parchemin sous la peau des lapins non réfractaires, que, sous l'influence des liquides du tissu cellulaire sous-cutané, les spores périssent relativement assez vite, environ 11 jours après l'inoculation. J'ai refait ces expériences plusieurs fois avec des résultats absolument contraires à ceux de Peckelharing, en ce sens que sur 13 lapins, 3 seulement ont survécu, tandis que les 10 autres ont succombé au charbon. Les spores qui sont restées dans le sac en parchemin, sous la peau du lapin, même pendant 45 jours, ont parfaitement conservé leur vitalité et leur faculté de germination ; dans un cas, ces spores, inoculées à une souris blanche, n'ont pas tué l'animal ; mais dans les autres cas, les spores ont conservé leur vitalité et en même temps leur virulence.

Mes expériences étaient conduites de la façon suivante : Pour ces inoculations, je me servais soit d'un fil trempé dans une culture de charbon contenant des spores, fil desséché dans

l'étuve et préparé depuis le mois de mai 1890, ou bien d'un fil fraîchement préparé; dans d'autres cas, je prenais, avec l'anse de platine, des spores fraîches d'un culture sur gélose, que je plaçais directement dans le sac en parchemin; dans d'autres cas encore je mettais dans le sac une petite quantité de gélose avec les spores qui y poussaient. Dans aucun cas les spores n'étaient accompagnées de bacilles.

De son côté, le sac en parchemin était préparé en roulant plusieurs feuilles très minces de parchemin végétal, lavé à l'eau bouillante, en forme de tube dont un bout était ensuite fortement serré et lié avec un fil de soie solide. Le tube ainsi préparé et la soie destinée à la ligature du bout supérieur étaient ensuite placés dans un autoclave et stérilisés à 120°. On introduisait alors dans le sac le fil chargé de spores, et on liait l'extrémité supérieure avec le fil de soie stérilisé. Le sac chargé, dont les bouts avaient été rabattus aux ciseaux, était alors introduit sous la peau du lapin. Quand l'inoculation devait être faite avec des spores libres, ou un fragment de culture sur gélose, on plaçait les éléments virulents sur une bandelette de parchemin stérilisé, qu'on enroulait en tube au moyen d'une pince stérilisée, qu'on liait à ses deux extrémités au moyen de la même pince, qu'on introduisait ensuite sous la peau du lapin, soit telle quelle, soit en l'entourant d'un autre tube de parchemin, préparé comme nous l'avons dit plus haut.

La région de la peau où l'inoculation devait être faite était rasée et lavée avec une solution acidulée de sublimé au 1000^e; dans la grande majorité des cas, de crainte de pénétration du sublimé dans l'incision, ce qui aurait empêché le développement des spores, les lavages étaient faits d'abord avec de l'eau, ensuite avec de l'alcool absolu. Une fois la peau bien séchée, on faisait l'incision et on introduisait dans la plaie le sac en parchemin. La plaie était ensuite suturée, lavée à l'alcool et couverte d'une couche de collodion non iodoformé.

Les lapins inoculés de cette façon succombaient au charbon dans l'espace de 60 heures à 6 jours 1/2 après l'introduction du sac en parchemin. Dans tous les cas, les plaies sont restées propres, n'ont pas suppurré; mais, lorsque le sac était resté long-temps sous la peau, on le trouvait couvert d'un dépôt fibineux, et dans un cas où le sac était resté 45 jours, on le trouva

entouré d'un tissu cicatriciel. L'examen microscopique du contenu des sacs restés sous la peau était fait sans coloration préalable, ou bien les préparations étaient colorées à la fuchsine et au bleu de méthylène. En plus, chaque fois que le sac était retiré, pendant la vie ou après la mort de l'animal, son contenu était ensemencé sur gélatine ou sur gélose dans des tubes ou dans les soucoupes de Petri.

Dans toutes ces expériences, les spores, après leur séjour sous la peau dans les sacs de parchemin, même les spores qui sont restées pendant 45 jours dans l'organisme de l'animal, se sont développées dans les soucoupes de Petri. Quant à la virulence de ces spores, on peut en juger par les faits suivants : un cobaye inoculé avec le contenu d'un sac resté 9 jours sous la peau du lapin est mort du charbon dans l'espace de 36 heures ; un autre cobaye inoculé de la même façon avec le contenu d'un sac retiré au bout de 45 jours, a également succombé au charbon. Dans un cas seulement, le contenu d'un sac resté 45 jours sous la peau du lapin n'a pas tué le cobaye ni la souris blanche auxquels il fut inoculé.

Sur les préparations colorées faites avec le contenu du sac retiré pendant la vie des animaux, on ne voyait qu'une masse de spores non développées, bien colorées en rouge, mais on n'y trouvait pas de bacilles ni de filaments charbonneux. Sur la surface externe du sac, et entre les deux feuillets de parchemin quand le sac était double, on voyait quelquefois un grand nombre de leucocytes, dont quelques-uns contenaient des spores rouges et des spores bleues. Une fois on trouva à l'intérieur du sac un microcoque étranger et quelques leucocytes. Dans deux autres cas, les ensemencements ont donné des cultures pures du bacille du charbon ; dans un cas les spores avaient été introduites avec de la gélose dans le sac double ; dans l'autre les spores étaient portées sur un fil, le sac était simple, et la plaie ne fut pas lavée au sublimé.

Dans tous les autres cas, à côté d'un grand nombre de spores rouges non germées, on trouvait des bacilles et quelquefois une quantité considérable de filaments longs. Lorsque le lavage de la peau n'était pas fait avec le sublimé, on trouvait quelquefois des microcoques étrangers. Mais l'ensemencement donnait toujours lieu au développement de colonies nombreuses de charbon.

Parmi les animaux inoculés avec le contenu du sac qu'ils avaient eux-mêmes gardé, un seul a succombé au charbon 12 heures après l'inoculation du contenu, qui était resté dans le sac sous la peau pendant 6 jours. Sur une préparation faite avec les tissus de la poche qui renfermait le sac, immédiatement après qu'on a retiré ce sac, on trouva des bacilles. Il est très possible que l'animal serait resté vivant si le sac eût été laissé en place et si l'animal n'eût pas subi une autre inoculation sous la peau de l'oreille.

Le second lapin inoculé avec le contenu du sac resté sous sa peau pendant 9 jours, a survécu à cette inoculation, mais il a succombé plus tard à l'inoculation d'une culture virulente du charbon, 36 heures après l'injection. Un cobaye inoculé avec le contenu du sac du même lapin a succombé au charbon 38 heures après l'injection.

Le lapin qui a gardé le sac en parchemin pendant 15 jours a survécu à l'inoculation du contenu sous la peau de son oreille ; mais un cobaye inoculé avec le même contenu a succombé au charbon au bout de 63 heures. Ce même lapin a été inoculé plus tard, à deux reprises, sous la peau de l'oreille, avec des cultures virulentes du charbon, mais a résisté à l'infection. Il avait donc acquis l'immunité contre le charbon ; il est mort plus tard de cause accidentelle, 100 jours après l'introduction du sac et 40 jours après la seconde infection. Le dernier des lapins restés vivants après avoir gardé leur sac de parchemin pendant 45 jours, est mort 62 jours après l'expérience, sans que le charbon ait pu être incriminé. Un cobaye et une souris, inoculés avec les cultures provenant de l'ensemencement du sac entouré de tissu cicatriciel de ce lapin, ont survécu.

Ces expériences ne démontrent nullement que les liquides organiques d'un lapin jouissant de l'immunité, possèdent des propriétés sporicides. En restant sous la peau de l'animal, dans un sac de parchemin, même pendant 45 jours, les spores ont toujours conservé leur vitalité. Elles ont aussi conservé leur virulence, sauf dans un seul cas, évidemment insuffisant pour permettre de conclure aux propriétés sporicides des liquides organiques d'un animal aussi sensible au charbon que l'est le lapin.

Avant de recourir à cette explication des résultats de

M. Peckelharing, on peut se demander s'il n'y en aurait pas d'autres plus probables, l'influence de la privation d'oxygène par exemple, ou celle de l'acide sulfurique resté dans la trame du parchemin végétal, ou encore celle des lavages au sublimé tels que les faisait M. Peckelharing, ou encore la pénétration de microbes étrangers dans la plaie. On sait, par les recherches de M. Blagowestchensky⁴, que les spores du charbon ne germent pas en présence du bacille pyocyanique, et il est probable qu'elles redoutent aussi le contact d'autres microbes. Quoi qu'il en soit, il y avait certainement une différence entre les dispositions expérimentales de M. Peckelharing et les miennes. Chez lui, les animaux ne mouraient pas; chez moi, malgré la solidité du sac et la ligature solide des deux bouts, les leucocytes y pénétraient et l'infection se manifestait. Il est vrai que dans quelques cas rares (surtout avec les sacs doubles ayant reçu des spores sur gélose), les spores ne se développaient pas, et qu'on ne trouvait ni leucocytes, ni bacilles. Mais ce qui prouve que ce non-développement n'était pas attribuable aux liquides organiques, c'est que, dans les autres expériences, les conditions étant les mêmes et les liquides organiques n'ayant pas changé, les spores se développaient très bien. Nous avons déjà vu du reste qu'elles se développent même chez les animaux jouissant de l'immunité.

X

Après avoir ainsi démontré que les spores pathogènes germent dans l'organisme des animaux, même de ceux qui jouissent de l'immunité, j'ai voulu voir s'il en est de même pour les spores des microorganismes notoirement non pathogènes.

A cet effet j'introduisais des spores du *Bacillus subtilis* et du *Bacillus megaterium* dans la chambre antérieure de l'œil du lapin, dans laquelle les spores d'autres microorganismes se développent très bien. Dans une autre série d'expériences, ces spores étaient introduites dans les veines des lapins et sous la peau des grenouilles. Pour ces expériences, je prenais des spores sans bacilles provenant de cultures sur gélose, ou bien des spores

4. Ces *Annales*, t. IV, p. 689.

ayant séjourné pendant quelque temps dans de l'eau distillée.

Sur les préparations faites avec le liquide de l'œil à divers intervalles après l'introduction des spores des deux espèces, et colorées à la fuchsine et au bleu de méthylène, on trouvait soit des spores colorées en rouge, soit une absence complète de spores; en tout cas, on ne trouvait pas de spores germées. On trouvait bien des leucocytes renfermant des spores, mais on ne voyait pas de bacilles ni de filaments. Ce fait permettait de supposer que les spores du *Bacillus subtilis* ou du *Bacillus megaterium* ne se développaient pas dans la chambre antérieure de l'œil. Pour voir si le liquide de la chambre antérieure de l'œil du lapin constitue un milieu propre à la germination des spores de ces deux bacilles, je prélevais de l'humeur aqueuse dans un tube et l'ensemencais avec des spores. L'ensemencement une fois fait, je plaçais le tube bouché avec un tampon d'ouate dans l'étuve à la température de 34-36°. Dans ces conditions les spores du *Bacillus subtilis* germent et donnent des bacilles, mais en petit nombre. J'ai fait alors, dans des lamelles concaves, des gouttes suspendues avec de l'humeur aqueuse ensemencée avec les spores du *Bacillus subtilis*. Après un séjour de 18 heures dans l'étuve, on trouvait déjà des bacilles mobiles, situés principalement vers les parties périphériques de la goutte. Au bout de 48 heures, le nombre de bacilles avait notablement augmenté; vers la partie centrale de la goutte il y avait encore une grande quantité de spores non germées, tandis que, au pourtour, on trouvait à côté des bacilles un grand nombre de filaments formant des sortes d'îlots. Il est évident que les bacilles se portaient vers les parties où l'accès de l'air était facile. La même cause fait que les spores germent mal dans un tube effilé, mince, et que le développement ne se fait qu'au niveau des couches superficielles des liquides, les parties profondes contenant exclusivement des spores non développées. J'ai de même observé la germination des spores du *Bacillus megaterium*, et plus tard la sporulation des bacilles dans des gouttes suspendues d'humeur aqueuse, comme pour le *Bacillus subtilis*.

L'humeur aqueuse de l'œil du lapin est donc loin d'être un milieu impropre au développement des deux bacilles en question, et s'il ne se fait pas dans l'œil même, c'est peut-être à cause de l'absence de la quantité d'oxygène nécessaire.

J'ai pu confirmer les résultats de M. Wyssokowitch relatifs à la longue persistance des spores du *Bacillus subtilis* dans l'organisme des animaux. J'ai obtenu des ensemencements positifs avec des parcelles de reins et de rates de lapins tués 20 et 32 jours après inoculation du *Bacillus subtilis*, et avec la rate d'une grenouille tuée 64 jours après avoir reçu sous la peau une inoculation de spores de ce bacille. Par contre, je ne suis pas d'accord avec ce savant sur ce fait que ces spores seraient plus rapidement détruites dans le poumon que dans les autres organes. Après avoir introduit simultanément et en même quantité des spores de *Bacillus subtilis* dans la veine auriculaire et dans la trachée d'un lapin, j'ai tué l'animal par le chloroforme 24 jours après, et ensemencé ses organes sur gélatine sur des soucoupes de Petri. Le foie et le poumon ont donné une quantité énorme de colonies, sans différences bien sensibles entre les deux. Il y en avait bien moins avec la rate et le rein.

Les poumons, les reins, le foie, la rate des lapins sacrifiés 18 jours après l'introduction des spores du *B. megaterium* ont donné aussi des colonies nombreuses.

Introduites dans le sac lymphatique d'une grenouille conservée à la température ordinaire, ces spores ne germent pas, et sont saisies par les leucocytes qui, au bout de 18 heures, en contiennent déjà beaucoup. Au bout de 7 jours, il y a encore des leucocytes contenant beaucoup de spores qui se colorent en rouge.

Tout ceci montre que les spores des *B. subtilis* et *megaterium* ne germent pas dans l'organisme du lapin et de la grenouille, mais peuvent y conserver longtemps leur vitalité.

XI

De toutes ces recherches résultent les conclusions suivantes :

1^o Il existe des faits qui démontrent que, dans certains cas, les cellules amiboides peuvent détruire, en se les incorporant, les spores pathogènes, et exercent sur elles une action sporicide ;

2^o Les spores pathogènes que j'ai étudiées peuvent germer et donner des bactéries dans l'organisme des animaux réfractaires envahis, que ces animaux jouissent d'une immunité naturelle, ou d'une immunité acquise.

3^o Immédiatement après la pénétration des spores des microbes pathogènes dans l'organisme des animaux réfractaires, commence une accumulation de leucocytes qui englobent les spores en question;

4^o Les spores qui ont eu le temps de germer et de se transformer dans l'organisme de l'animal, les bacilles et les filaments sont également saisis par les leucocytes qui les détruisent;

5^o Les spores saisies avant leur développement par les cellules ne se développent pas tant qu'elles se trouvent à l'intérieur des cellules, à la condition que ces dernières soient vivantes et non affaiblies;

6^o Si, sous l'influence de certaines circonstances, le phagocyte s'affaiblit ou meurt, les spores vivantes qu'il a saisies germent et se transforment en bacilles et filaments;

7^o Ces bacilles et ces filaments peuvent être ressaisis par les leucocytes et détruits;

8^o Les spores renfermées dans les cellules sont transportées par ces dernières dans tous les organes de l'animal où elles peuvent se conserver très longtemps vivantes et virulentes;

9^o Dans la majorité des cas, les cellules ne détruisent pas les spores du microbe pathogène, mais empêchent seulement leur développement;

10^o Les liquides d'un organisme vivant ne possèdent pas de propriétés sporicides;

11^o Toutes les spores ensemençées dans les milieux de culture ne se développent pas; il en est de même des spores pathogènes introduites dans un organisme vivant;

12^o Les spores germent et donnent des bactéridies aussi bien dans la lymphe des grenouilles réfractaires chauffée à 34-37° que dans la lymphe non chauffée;

13^o Les spores du charbon introduites sous la peau des grenouilles germent régulièrement quand même l'animal est maintenu à la température de la chambre (16 à 22°);

14^o Lorsque les spores restent longtemps à une basse température dans l'organisme des grenouilles, elles ne se développent pas et sont saisies par les cellules; si on les place à une température suffisamment élevée, les spores ne germent plus, empêchées par des cellules qui les renferment;

15^o Une première infection ne fait pas de l'organisme animal

un milieu impropre au développement des spores charbonneuses dans le cas d'une nouvelle infection. Dans ces conditions, les spores germent fort bien et l'animal peut succomber à la seconde infection.

16^o Les spores des microbes pathogènes qui n'ont pas germé dans l'organisme y conservent longtemps leur vitalité;

17^o Chez les animaux ne jouissant pas de l'immunité, les spores pathogènes sont également saisies par les leucocytes; seulement les phagocytes se trouvent en petit nombre, les spores germent, passent à l'état végétatif et amènent la mort de l'animal.

En terminant ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à M. le professeur Metchnikoff pour ses conseils, et les indications précieuses qu'il m'a prodiguées tout le temps que j'ai travaillé sous sa direction.

EXPLICATION DES FIGURES.

PLANCHE X

FIG. 1. et 2. — Spores de *Monospora bicuspidata* enveloppées par des leucocytes.

FIG. 3. — Leucocyte de grenouille, 25 heures après l'injection des spores charbonneuses.

FIG. 4. — Leucocyte d'une grenouille, maintenue dans la chambre, 72 heures après l'injection des spores.

FIG. 5. — Bactéridies issues des spores dans la lymphe de la même grenouille.

FIG. 6 et 7. — Deux autres leucocytes de la même grenouille.

FIG. 8. — Un macrophage d'une grenouille maintenue à l'étuve, 43 heures après l'injection des spores charbonneuses.

FIG. 9 et 10. — Deux leucocytes d'une poule 4 heures après l'injection des spores charbonneuses.

PLANCHE XI

FIG. 1. — Deux leucocytes d'une grenouille renfermant des spores et des bâtonnets.

FIG. 2 et 3. — Lymphe d'une grenouille laissée à l'étuve. La lymphe a été retirée 18 heures après l'introduction des spores.

FIG. 4. — Leucocyte d'une grenouille renfermant des spores non germées dans la lymphe, puisée plusieurs jours après l'infection.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE DES LEVURES ALCOOLIQUES DU LACTOSE

PAR M. E. KAYSER.

(Travail du laboratoire de fermentations, à l'Institut agronomique.)

La première levure capable de faire subir au sucre de lait la fermentation alcoolique a été isolée et décrite par M. Duclaux dans ces *Annales* (1887, p. 573). Depuis, M. Adametz, à l'Institut agronomique de Vienne, en a étudié¹ une seconde, qu'il a jugée différente de la première, mais sans le prouver suffisamment. J'en ai retiré moi-même, d'un lait provenant d'une ferme de la Brie, une troisième, qui me semble ne se confondre avec aucune des deux autres². Mais comme j'estime que ces questions de ressemblance et de différence sont de celles que ne saurait régler l'étude des formes et des dimensions du microbe, ou celle de ses cultures sur divers milieux, je me suis attaché à poursuivre la comparaison de ces trois levures sous toutes les faces que revêt leur vie physiologique, telle que nous la connaissons en ce moment. Pour les distinctions délicates auxquelles nous oblige la science dans le monde des microbes en général, et dans celui des levures en particulier, la morphologie ne suffit pas, et même la physiologie suffit à peine.

C'est donc une étude physiologique comparative de ces levures que je vais faire, et d'où ressortiront leurs ressemblances ou leurs différences. J'appellerai *a* celle de M. Adametz, *b* celle de M. Duclaux, *c* la mienne.

1. *Centralbl. f. Bact.*, t. V, 1889, p. 416. V. aussi ces *Annales*, t. III, p. 201.

2. Il y en a peut-être une quatrième, décrite récemment par M. Weigmann, de Kiel (sur la formation des trous et la soufflure des fromages, *Milchzeitung*, 1890, n° 38, p. 743), mais avec trop peu de détails pour qu'on puisse avoir une opinion

Elles ont ceci de commun que je n'y ai jamais observé la formation de spores, même après un mois de séjour dans l'eau distillée ou sur plâtre, aux températures de 5, 15 et 25 degrés.

La levure *a* (fig. 4) est formée de globules ovales, elliptiques, dont la longueur moyenne est de 7 à 10 μ , la largeur de 3 μ . Ils prennent quelquefois une forme sphérique et ont alors de 3 à 4 μ de diamètre. Cette levure donne souvent des bourgeons simultanés aux deux extrémités d'un même globule. Elle meurt à l'état humide vers 56°, mais à l'état sec elle peut être chauffée au delà de 100° sans périr¹.

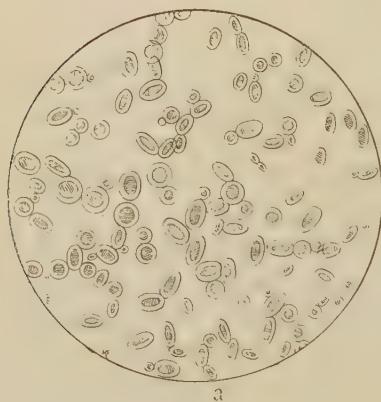


Fig. 4.



Fig. 2.

La levure *b* (fig. 2) est plus petite que la précédente, et ronde, surtout dans les milieux neutres ou un peu alcalins; les dimensions sont de 1 à 3 μ ; elle bourgeonne à la façon des levures hautes, en donnant des paquets rameux. Elle meurt à 50° à l'état humide, et entre 50 et 60° à l'état sec. Elle est donc très peu résistante.

sur elle. On peut en dire de même pour la levure décrite par M. Grotfeld, sous le nom de *Saccharomyces lactis acidi* (*Fortschr. d. Med.*, 1889, t. IV), et de celles décrites par M. Beyerinck sous les noms de *Saccharomyces Kefyr* et *tyrocola* (*Centralbl. f. Bact.*, 1889, t. II).

1. Comme dans mes précédents travaux, j'ai fait la dessiccation sur des spirales de platine, après avoir dilué dans de l'eau stérilisée la levure, que j'empruntais à une fermentation terminée. Ces spirales, qu'on laissait d'abord se dessécher avec lenteur, étaient ensuite portées à la température voulue et immersées ensuite dans du moût stérilisé.

La levure *c* (fig. 3) présente, comme la première, des globules ronds et elliptiques, mais elle est plus petite que *a* et plus grande que *b*. Les dimensions moyennes sont de 6 à 8 μ pour la longueur, de 3 à 5 μ pour la largeur. Elle meurt à l'état humide à 55°, et entre 90° et 100° à l'état sec.

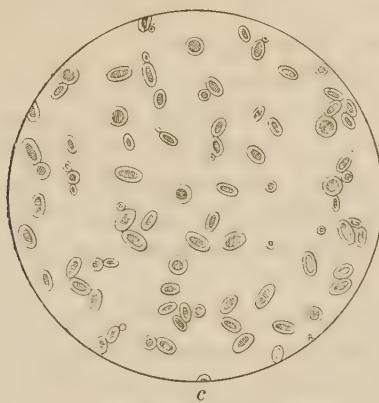


Fig. 3.

Sur gélatine, ces 3 levures se comportent sensiblement de la même manière et s'étendent en largeur plus que ne le font les levures de vin ou de bière; elles présentent, au centre de la colonie, une surélévation plus ou moins épaisse, et poussent sur les bords de fins rayons auréolés qui ont des aspects de mycélium. M. Adametz avait insisté sur ce caractère à propos de la levure *a*; je le retrouve très marqué aussi pour la levure *c*. Il est toujours un peu moins accusé avec la levure *b* qu'avec les deux autres.

Dans les milieux rendus acides, soit dès l'origine, soit par suite de la fermentation, la levure *b* conserve à peu près ses formes habituelles, mais les deux autres deviennent rameuses, surtout si l'acidité est notable. Le fait est surtout marqué pour la levure *a* dans l'acide oxalique, et pour la levure *c* dans l'acide tartrique. Cette dernière devient aussi rameuse, et donne même de véritables arborescences quand elle est introduite à l'état jeune dans l'eau distillée. J'ai dit plus haut que dans ces conditions, et contrairement au cas des levures de bière, il ne se forme pas de spores.

Dans les milieux neutres et le lait, la fermentation exige, pour bien marcher, le concours de la chaleur et d'une aération suffisante. La température la plus favorable est de 25° à 30°. Quant à l'oxygène, M. Duclaux avait déjà remarqué que sa levure commençait une vie anaérobie à des degrés d'aération où les autres levures auraient brûlé une grande partie du sucre sans le faire fermenter, et qu'elle s'affaiblissait lorsqu'on la faisait passer de fermentation en fermentation, sans la laisser revenir au contact de l'air. Les autres se comportent de même.

Quant à la rapidité, c'est la levure *b* qui part en général la première, la levure *c* ne vient qu'en 3^e ligne. Le sucre disparu se transforme en alcool. Le lait ne devient pas visqueux. Il ne se coagule pas. On trouve seulement au fond un fin dépôt de levure et de caséine grevée. La saveur est agréable et nettement alcoolique.

Pour comparer ces 3 levures, je les ai fait agir simultanément sur des solutions de sucres divers, lactose, saccharose, maltose, galactose, glucose, sucre interverti, additionnées de bouillon Liebig. La galactose et la glucose étaient des produits donnés comme purs dans le commerce, la maltose provenait de la maltoserie de Creil.

Les liquides fermentés, placés dans des ballons bouchés à la ouate pour laisser place à l'air nécessaire à la fermentation, ont été étudiés à la façon ordinaire. On a laissé de côté l'alcool, dont une partie s'était perdue par évaporation dans les conditions de l'expérience. Le sucre restant était dosé par la liqueur de Fehling ; l'acidité au moyen de l'eau de chaux, et évaluée en acide lactique.

Le tableau suivant donne pour chaque groupe d'expériences la quantité de sucre et d'acide dans la liqueur initiale, la quantité de sucre restant au moment où on a arrêté les fermentations, la quantité de sucre transformée pendant leur durée commune par les levures *a*, *b* et *c*, et éventuellement, pour la galactose et la maltose, par une levure *m* de bière, prise comme terme de comparaison avec les levures ordinaires des brasseries. Enfin, on y trouvera aussi les poids de levure produite, après dessiccation à 100°, et les quantités d'acide formées, évaluées en acide lactique. Tous les nombres sont rapportés au litre.

		Sucre restant.	Sucre disparu.	Levure produite.	Acidité.
Lactose 60 ^{gr} ,30 par litre.	a	23,60	34,70	0,510	4,520
	b	23,60	34,70	0,270	1,050
	c	21,40	38,90	0,450	1,790
Galactose 36 ^{gr} ,80 par litre acid. i nit. 0,300.	a	16,80	20,00	0,315	1,770
	b	1,67	35,13	0,480	1,100
	c	15,84	20,96	0,270	1,280
	m	20,80	16,00	0,370	0,790
Glucose 37 ^{gr} ,3 par litre, acid. init. 0,480.	a	2,34	34,96	0,590	2,030
	b	0,00	37,30	0,215	1,370
	c	0,00	37,30	0,485	1,740
Sucre interverti 56 ^{gr} ,80 par litre.	a	2,22	54,58	0,413	"
	b	3,23	53,55	0,240	"
	c	2,79	54,01	0,270	"
Maltose 98 ^{gr} ,3 par litre, acid. init. 0,600.	a	73,76	24,54	0,575	1,425
	b	73,12	25,18	0,395	1,480
	c	74,40	23,90	0,475	1,280
	m	6,84	91,46	0,735	1,830
Eau de malt 66 ^{gr} ,35 maltose par litre.	a	55,05	41,30	0,400	"
	b	53,83	43,00	0,307	"
	c	52,80	43,55	0,347	"
	m	8,55	57,80	1,946	"

Le premier fait qui frappe quand on consulte ce tableau est la distinction entre les levures de lactose et les levures ordinaires. On sait par les expériences de M. Duclaux que celles-ci ne font pas fermenter le sucre de lait, et le brûlent lentement. Dans les miennes, la levure *m* de bière fait aussi fermenter plus péniblement la galactose que les levures de sucre de lait. En revanche ces levures font fermenter très péniblement la maltose, dans laquelle la levure *m* donne au contraire une fermentation très active.

Vis-à-vis de la glucose, du sucre interverti, de la saccharose même, les levures étudiées se comportent comme vis-à-vis de la

lactose. Pour bien montrer leur quasi-indifférence entre la lactose et la saccharose, j'ai additionné deux échantillons de petit-lait, renfermant par litre 45 grammes de lactose, l'un de 50 grammes de saccharose, l'autre de 50 grammes de lactose environ par litre, et je les aiensemencés simultanément avec les levures *b* et *c*. Au bout d'un même temps, j'ai trouvé que les résidus d'évaporation à 100° étaient exprimés par les chiffres suivants :

	<i>b</i>	<i>c</i>
Petit-lait + lactose	21,1	21,6
Petit-lait + saccharose	20,5	49,7

C'est-à-dire à très peu près les mêmes, et qu'il ne restait plus de sucre daucun côté. La saccharose avait donc été transformée aussi vite que la lactose.

Voici un autre mode de comparaison. J'aiensemencé dans de l'eau de touraillons, additionnée de 60 grammes par litre de sucre ordinaire, une levure de *pale ale* et la levure *c* de lactose. L'analyse des liquides au bout du même temps a donné les résultats suivants :

	Liq. initiale.	Levure de bière.	Levure <i>c</i> .
Extrait	65,0	4,9	6,3
Sucre	58,4	0	0
Poids de levure	»	1,475	1,125
Acidité	0,270	4,830	2,020

Ainsi les sucres d'une levure ne sont pas les sucres d'une autre, et les prédispositions diverses peuvent servir à créer des groupes naturels.

J'ai essayé de voir si ces levures qui font fermenter la lactose ne pourraient pas agir sur d'autres matières sucrées telles que mannite, perséite, raffinose, inosite, dulcite, dextrine, mélénitose, tréhalose et sorbine; aucun de ces hydrates de carbone n'a donné lieu à une fermentation alcoolique, ce dont je me suis assuré en faisant la réaction de l'iodoforme.

Les levures de la lactose se comportent vis-à-vis de ces sucres comme la levure ordinaire vis-à-vis du sucre de lait; elles les brûlent tout simplement sans produire de l'alcool.

J'ai observé cependant que dans la mannite, la dulcite, la

perséite, les globules devenaient disformes et s'allongeaient beaucoup ; la levure *a* a surtout montré de très belles ramifications.

Par contre dans la raffinose, l'inosite, la mélézitose, la dextrine, la tréhalose, les globules conservent, en général, leur forme normale ; dans la sorbine elles ont une tendance à prendre la forme sphérique et à grossir, tout en s'enflant démesurément.

Si nous arrivons maintenant à comparer les actions des diverses levures sur un même sucre, nous voyons qu'au point de vue du sucre qu'elles ont transformé dans le même temps, elles sont à peu près toutes trois au même niveau. Vis-à-vis de la galactose, la levure *b* a seule témoigné d'une activité plus grande ; mais ce fait étant isolé, il n'y a pas lieu d'insister pour le moment.

Le parallélisme ne persiste pas en ce qui concerne l'acidité. On voit que dans tous les sucres que ces levures font bien fermenter, la levure *b* produit moins d'acide que ses congénères, et plus que la levure *m* de bière dans la galactose. Les différences sont même très sensibles. Dans la maltose c'est l'inverse. C'est la levure *b* qui donne l'acidité la plus grande.

Quant aux poids de levure provenant de la fermentation de quantités approximativement égales de sucre, ils sont aussi assez différents, et on voit que sous ce point de vue, les trois levures se rangent dans l'ordre décroissant *a*, *c*, *b*. La seule exception est relative à la galactose, où *b* tient la tête. Mais c'est que le poids de galactose transformée est aussi plus grand. En dernière analyse, c'est *b* qui donne les poids de levure les plus faibles, et c'est là un fait à rapprocher de celui que nous avons relevé tout à l'heure au sujet de l'acidité. Il s'explique bien si l'on admet, comme l'a soutenu M. Duclaux, que la sécrétion de l'acide soit un phénomène de vie cellulaire, indépendant dans une certaine mesure de cet autre phénomène de vie cellulaire qui amène la transformation du sucre. Pour des quantités égales de sucre fermenté, ce sont les poids vivants les plus faibles qui doivent donner le moins d'acide.

Il est curieux de rapprocher aussi de ce fait cet autre que l'ordre des grandeurs décroissantes des cellules est le même : *a*, *c*, *b*. Les inégalités dans les dimensions des cellules de la même levure empêchent de pousser plus loin l'étude de la question, et de se demander si le rapport des poids de cellules nécessaires pour faire fermenter une même quantité de sucre est le même que le

rappor t des cubes des dimensions homologues. S'il en était ainsi, cela prouverait que l'activité protoplasmique n'est pas la même partout, et que l'unité de matière active est la cellule et non l'unité de poids du protoplasma. Cette question vaut bien qu'on la vise en passant, lorsqu'on la rencontre sans la chercher.

Je n'ai pas étudié de près l'influence de température, à cause de la difficulté qu'il y a à la caractériser par des nombres. Je me suis contenté de constater que ces levures de lactose ne sont pas des levures basses, et ne s'accommode nt pas du voisinage de 0°. A la cave à 5°, la fermentation a à peine commencé lorsqu'elle est terminée à l'étuve à 25°.

Une question plus intéressante, au double point de vue de la théorie et de la pratique, était de savoir quelle dose maximum d'acide et de sucre pouvaient supporter ces levures sans cesser de se développer. On pouvait en effet se demander s'il n'était pas possible de transformer avec elles en une liqueur alcoolique acceptable les quantités énormes de petit-lait que l'industrie des fromages produit annuellement, et de trouver ainsi pour ce liquide un mode d'emploi plus rémunérateur qu'aucun de ceux qui sont usités jusqu'ici. Ce sérum renferme en effet, outre son sucre de lait, un peu de matière grasse et des substances azotées et minérales de premier ordre pour l'alimentation. Mais il est d'ordinaire acide par suite d'un commencement de fermentation lactique. De plus il est pauvre en sucre, la quantité maximum d'alcool qu'on peut espérer y produire est de 2 à 3 % : il était intéressant de chercher à l'augmenter soit par des additions de lactose, soit au moyen de sucre ordinaire. A ce point de vue, l'étude des diverses levures de lactose s'imposait, et pouvait dans tous les cas nous fournir de nouveaux éléments de différenciation.

Pour étudier l'influence de l'acidité, j'ai préparé quatre liquides contenant par litre les mêmes quantités de sucre de lait (53^{gr}, 51) et de bouillon Liebig (7^{gr}, 2), mais dont les acidités étaient inégales, et représentées respectivement par 2^{gr}, 31, 14^{gr}, 23, 26^{gr}, 15 et 38^{gr}, 80 d'acide lactique par litre. J'y ai ensemencé mes trois levures, et voici ce qui restait de sucre dans les divers essais au bout de sept semaines d'étuve.

	1	2	3	4
	ac. 2gr, 31.	ac. 14gr, 23.	ac. 26gr, 15.	ac. 38gr, 80
Sucre restant	{ a 2gr,75 b 2gr,82 c 2gr,60	{ 3gr,27 17gr,05 3gr,13	{ 40gr,20 45gr,80 39gr,25	{ 50gr,25 53gr,00 50gr,80

La levure *b* est donc la plus sensible à l'augmentation de l'acidité. Elle ne s'est pas du tout développée dans le liquide 4, tandis que les deux autres s'y étaient multipliées, mais à l'état de végétal cellulaire, et sans donner de fermentation. C'est la levure *c* qui semble supporter le mieux la présence des acides. Mais on voit qu'il ne faut guère dépasser pour elle et pour la levure *a* une dose de 1,5 0/0 d'acide lactique. Il est rare que le sérum de coagulation du lait, même dans la fabrication du fromage de Brie, manifeste une acidité s'élevant à ce chiffre.

Pour étudier de même l'influence d'une augmentation dans la quantité de sucre, j'ai additionné du petit-lait de lactose de façon à lui faire contenir 153,5 d'extrait par litre, dont 133,1 de lactose. J'aiensemencé ce liquide avec les trois levures, et j'ai laissé la fermentation marcher jusqu'au moment où le dégagement visible de bulles a cessé. L'étude des liquides a donné les résultats suivants :

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
Lactose restante.....	43gr,2	56gr,0	28gr,3
— disparue.....	89gr,9	77gr,1	104gr,8
Alcool en poids.....	39gr,64	31gr,72	44gr,32

Au lieu d'ajouter de la lactose au sérum, on pourrait le concentrer par évaporation de façon à augmenter sa richesse saccharine. Voici le résultat d'essais faits sur du sérum réduit à peu près au tiers, et contenant 143 gr. 6 d'extrait par litre, dont 92 gr. 5 de lactose. La fermentation a été interrompue au bout d'un mois.

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
Lactose restante.....	37gr,4	24gr,9	22gr,4
— disparue.....	55gr,4	67gr,6	70gr,1
Acidité totale.....	4gr,38	4gr,05	4gr,28
Acidité volatile.....	4gr,84	4gr,64	4gr,60
— fixe	2gr,54	2gr,41	2gr,68

On voit qu'au bout d'un mois, il y a environ 65 à 70 0/0 du sucre fermenté, ce qui correspond à 3,2 à 3,5 0/0 d'alcool. Je me

suis d'ailleurs assuré, par la méthode indiquée par M. Duclaux, que cet alcool est de l'alcool vinique à peu près pur.

On voit que dans ces essais, la levure *c* conserve sa prééminence; c'est aussi elle qui donne le moins d'acide volatil. Dans le tableau qui précède, toutes les acidités sont évaluées en acide lactique, mais les acides volatils sont uniquement formés d'acide acétique.

Au point de vue pratique, ces essais montrent qu'on peut obtenir facilement, au moyen du sérum de lait, des boissons contenant autant d'alcool que les bières les plus alcooliques, soit en opérant sur du petit lait concentré par évaporation, soit en ajoutant au sérum des fromageries du lactose ou de préférence des sucres ordinaires. Mais, quand on veut arriver à fabriquer une boisson courante nouvelle, il intervient des questions de saveur et de goût qu'il n'était pas dans le programme de ce travail d'examiner, mais dont j'ai voulu ébaucher l'étude.

Dans ce but j'ai ajouté de la lactose à du petit lait de façon à éléver la quantité de sucre à 87 gr. 50 par litre. J'en ai concentré une autre partie par l'ébullition, de façon à arriver à 92 gr. 50 de sucre. Ces liquides ont été neutralisés, stérilisés ensuite à 120°, ce qui a précipité une partie des matières albuminoïdes, puis filtrés dans des bonbonnes qu'on venait de laver avec de l'eau passée au filtre Chamberland. Deux bonbonnes, l'une de petit lait sucré, l'autre de petit lait concentré, ont été mises en fermentation avec une culture pure de levure *c*. Dans une troisième bonbonne de petit lait sucré, on aensemencé en même temps la levure *c* et le *Saccharomyces apiculatus*. La fermentation a commencé régulièrement partout. Au bout d'un mois, quand on l'a vue faiblir, on a mis le liquide en bouteilles, dans lesquelles la fermentation s'est réveillée et a continué. Un dégorgage, fait à la mode champanoise, permet d'éliminer les levures qui se déposent bien, et d'obtenir des liquides qui restent mousseux. Voici l'analyse de ces liquides étudiés après un mois de bouteille.

	Petit-lait sucré		Petit-lait concentré
	levure <i>c</i>	levure <i>c</i> et <i>S. apiculatus</i>	levure <i>c</i>
Sucre restant	29, 24	41, 72	23, 65
Alcool en poids	28, 80	36, 80	30, 00
Acidité	4, 35	4, 48	5, 98

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1888, p. 489.

La majeure partie du sucre avait donc disparu, surtout dans le liquide ensemencé avec la levure *c* et le *S. apiculatus*. A la dégustation, le liquide des deux bonbonnes a été reconnu posséder une saveur fraîche, alcoolique et piquante, se rapprochant de celle du cidre. Le liquide provenant du sérum concentré par l'ébullition avait une saveur beaucoup trop saline, et je crois qu'il n'y a rien à chercher de ce côté; mais le sérum additionné de sucre peut donner une boisson saine, rafraîchissante et économique, car au prix d'évaluation actuel du petit-lait, l'addition de 30 grammes de sucre par litre n'élèverait pas à plus de 10 francs l'hectolitre la valeur de la boisson obtenue.

Il y aura à éviter la saveur de cuit que présente le petit-lait qu'on a chauffé pour le stériliser; cette stérilisation est indispensable si on veut que la levure de lactose prenne rapidement possession du liquide. Elle ne s'accommoderait pas d'un milieu déjà peuplé par des espèces plus vivaces. Mais si on laisse au sérum un peu d'acidité, ce qui ne peut être qu'utille, la stérilisation pourrait se faire au-dessous de 100°. Il y a là toute une pratique à étudier, et ce n'est pas dans un laboratoire de Paris qu'on peut le faire.

J'aurais même été assez embarrassé pour mes essais si M. P. de Monicault, ancien élève de l'Institut agronomique, et M. Bailière, propriétaire de la ferme du Paradis-en-Brie, ne m'avaient rendu le service de me procurer en quantité suffisante du sérum tout à fait *authentique*. J'ai plaisir à les remercier ici de leur obligeance.

REVUES ET ANALYSES

SUR LA DIGESTION DANS L'INTESTIN GRÈLE

REVUE CRITIQUE

EWALD, *Virchow's Archiv*, t. LXXV, 1878. — HARRIS et H. TOOTH, Relation des microbes avec la digestion pancréatique, *Journal of Physiology*, t. IX, p. 220. — SH. LEA, Études comparatives sur la digestion naturelle et artificielle, *Id.*, t. XI, p. 226. — A. MACFADYEN, M. NENCKI et N. SIEBER, Recherches sur les actions chimiques dans l'intestin grêle de l'homme, *Archiv. f. exp. Pathol.*, t. XXVIII.

Nous sommes revenus à plusieurs reprises, dans ces *Annales* (V. t. II, p. 613; t. III, pp. 126, 183), sur l'étude de la digestion stomachale. Nous profitons aujourd'hui du récent mémoire de Macfadyen, Nencki et Sieber pour parler de la digestion qui se fait dans l'intestin grêle. On sait peu de choses précises sur elle, bien qu'elle ait été très étudiée. Ce qu'on trouve en gros à son sujet, dans les livres élémentaires, c'est que le suc pancréatique et la bile, tous deux à réaction alcaline, saturent l'acidité du chyme en se mélangeant avec lui, amènent par là la précipitation de quelques-uns des éléments albuminoïdes qui s'y trouvaient dissous, et reprennent en sous-œuvre, en lui donnant une autre direction, le travail de dissolution commencé par l'estomac.

Si on veut préciser davantage, on tombe dans des questions de nomenclature des diverses matières albuminoïdes en voie de digestion, questions que je ne veux pas aborder aujourd'hui, d'abord parce qu'elles sont des plus confuses, ensuite parce qu'elles sont inutiles pour le sujet que je voudrais traiter. MM. Macfadyen, Nencki et Sieber ont en effet réussi à les éliminer, grâce à une circonstance très heureuse pour l'étude. Ils ont eu l'occasion de pouvoir observer une malade portant, à la suite d'une opération chirurgicale, une fistule placée au confluent de l'iléon et du cœcum. Cette fistule donnait issue à la masse alimentaire tout entière, après qu'elle avait subi, dans des conditions en apparence tout à fait normales, l'action de l'estomac et celle de l'intestin grêle tout entier. On pouvait donc, en profitant de ce que l'action de l'estomac est la mieux connue des actions digestives,

faire la part de ce qui revient à l'intestin grêle dans le procès général. Mais, ce qui est plus intéressant, on pouvait, en soumettant la malade à un régime régulier, et en recueillant par la fistule la totalité de la matière alimentaire non digérée, mesurer la proportion d'éléments absorbés dans l'estomac et l'intestin grêle, et la proportion réservée au travail dans le gros intestin.

Ces chiffres sont évidemment des plus intéressants, parce qu'ils sont indépendants de toutes les questions douteuses d'interprétation que nous rappelions tout à l'heure. Tous les aliments et les éléments ingérés qui manquent dans la masse évacuée par la fistule sont bien absorbés et digérés au sens habituel de ce dernier mot. Rien n'empêche du reste, et les auteurs du mémoire dont je parle n'y ont pas manqué, de rechercher ce qu'il y a, dans cette masse, de sucre, d'albumine précipitable par la chaleur, etc., de voir comment ces quantités varient avec le mode d'alimentation. Mais nous sommes encore si maladroits dans l'analyse immédiate de ces masses complexes, que tous ces résultats, si intéressants qu'ils soient, auront un poids moindre que ceux de l'analyse élémentaire, et, bien que ceux-ci soient en quelque sorte placés au second plan dans le travail de MM. Macfadyen, Nencki et Sieber, je demande à les mettre au premier.

Le régime journalier de la malade était le suivant :

Pain	260gr	avec 2gr,6	d'azote ou	16gr,2	mat. albumin.
Viande	100	3gr,33	—	20gr,8	—
Bouillie de gruau	200	0gr,31	—	3gr,2	—
2 œufs	100	2gr,0	—	12gr,5	—
Peptone	20	4gr,52	—	9gr,6	—
Lait	100	0gr,55	—	3gr,4	—
Bouillon	1,050	0gr,09	—	5gr,0	—
En tout		40gr,60	d'azote ou	70gr,7	de mat. albumin.

Je laisse de côté les boissons, vin, thé et café, qui ne changeraient pas beaucoup le total, et qui d'ailleurs sont considérées comme ne contenant que des matières directement assimilables.

Le séjour des aliments dans le canal intestinal était de durée assez variable. Pour s'en faire une idée, on mélangeait à la masse alimentaire des pois verts cuits, mais non broyés, et on surveillait le moment où on les voyait reparaitre à la fistule. Dans un cas, les premiers ont reparu après 2 heures 1/2, et les derniers après 14 heures. Dans une seconde expérience, les nombres ont été 3 heures 1/4 pour les premiers, 23 heures pour les derniers. On a aussi employé comme moyen d'épreuve le salol, que l'on retrouve dans l'intestin à l'état d'acide salicylique. Pour mettre ce dernier en évidence, on filtre les liquides recueillis à divers intervalles par la fistule, on ajoute au liquide filtré

quelques gouttes d'acide chlorhydrique, on traite par l'éther, qu'on laisse évaporer, et dont le résidu est essayé avec une goutte de perchlorure de fer. On a ainsi trouvé que l'évacuation du salol a duré dans un cas 14 heures, dans l'autre 9 heures seulement.

Comme la malade, restée six mois en observation, a été soumise pendant deux mois à une étude journalière, on pouvait recueillir assez de documents pour comparer, au point de vue pondéral, les matières sorties par la fistule aux matières ingérées.

La matière qui s'écoulait par un tube de caoutchouc inséré dans la fistule et qui se réunissait, sans que la malade eût conscience de l'évacuation, dans des flacons tarés, était de consistance plus ou moins épaisse, n'ayant qu'une odeur faible d'acides gras, parfois d'indol, et contenant de 5 à 10 % de matières solides. En moyenne, la quantité évacuée en 24 heures, lorsqu'elle était la plus fluide, était, pour le régime indiqué tout à l'heure, de 550 grammes avec 4,9 % de résidu solide; lorsqu'elle était le plus compacte, de 232 grammes avec 11,23 % de résidu sec. En moyenne, il sortait donc par la fistule 26^{gr},5 de matière, contenant 1^{gr},61 d'azote ou 10,06 de matières albuminoïdes.

« Comme la malade en recevait journallement 70^{gr},7 par jour, il en résulte qu'il n'y en avait que un septième ou environ 14,25 % réservé à la digestion et à l'absorption dans le gros intestin, pendant que 85,75 % avaient été résorbés dans l'estomac et l'intestin grêle. »

Je ne vois pas bien pourquoi les auteurs du mémoire ne tirent cette conclusion que pour l'azote. Ils auraient pu l'étendre au carbone et à l'hydrogène, en faisant des analyses élémentaires de ces deux éléments. On n'en trouve qu'une dans le mémoire et peut-être ont-ils eu peur que cela ne semblât trop peu. Mais ils auraient au moins pu prendre les aliments en bloc. Il est facile de calculer, avec les tables de calcul des rations, que le régime alimentaire de la malade comprenait journallement 300 grammes environ de matière sèche. Comme il n'en sortait que 26^{gr},5 environ par la fistule, on voit que l'absorption totale était encore plus grande que pour l'azote, et que par conséquent l'absorption des aliments gras et hydrocarbonés, au travers de l'estomac et de l'intestin, était encore plus active que celle des aliments azotés. En somme, pour la malade en question, un septième seulement des aliments azotés, et un quatorzième environ des aliments non azotés était réservé à l'absorption dans le gros intestin.

On se demande naturellement alors quelle eût été l'action du gros intestin de la malade, sur ce faible résidu, s'élevant en moyenne de 8 à 9 % de la matière alimentaire ingérée. On compte qu'un homme en bonne santé, ayant une nourriture variée, évacue chaque jour de 120 à 150^{gr} d'excréments, contenant de 30 à 37 grammes de matière solide pour environ 600 grammes de matière alimentaire sèche; c'est une

proportion de 5 à 6 %. L'action du gros intestin paraît donc négligeable, et cette conclusion semble un peu surprenante, en présence de l'énorme développement de cette partie du canal digestif comparativement avec les autres.

Cette conclusion présente de l'importance à un autre point de vue, au sujet de la part que prennent les microbes dans la digestion. On m'a reproché, dans certains mémoires insuffisamment documentés, d'avoir dit que sans les microbes la digestion serait impossible; je n'ai jamais soutenu d'opinion pareille. J'ai insisté sur ce fait qu'il n'y avait peut-être jamais eu d'expérience de digestion artificielle, sans que leurs résultats aient été troublés, plus ou moins, par l'intervention des microbes; j'ai dit que c'étaient surtout les digestions pancréatiques artificielles qui restaient sujettes à caution; j'ai dit aussi que la digestion de la cellulose me semblait seule une pure affaire de microbes, et qu'il en était de même de la digestion dans le gros intestin, où je n'avais pu trouver aucune diastase active qui ne pût être attribuée aux microbes qui l'habitent. J'ai ajouté que, en suite de quelques essais trop imparfaits pour que je me crusse autorisé à les publier, la moitié environ de la digestion totale me semblait attribuable aux actions microbiennes; mais au lieu de nier l'action des sucs normaux de l'organisme, j'ai cherché au contraire à la préciser, en indiquant à quelle espèce de substances alimentaires chacun d'eux avait pour mission de s'attaquer.

Le digestion stomachale incombe en entier ou à peu près au suc gastrique, du moins en ce qui concerne les matières albuminoïdes. Celles-ci sont en effet, comme l'ont révélé mes premières études sur le lait, très difficilement attaquables par les microbes en milieux acides. Ces milieux acides sont au contraire très favorables à l'attaque des substances hydrocarbonées, telles que les sucres. Il ne faut pourtant pas que l'acidité soit trop forte, et dans l'estomac les seules actions microbiennes un peu actives sont la fermentation des jus sucrés sous l'influence des levures, et un commencement d'attaque des mêmes sucres, surtout du sucre de lait, par le ferment lactique. D'ordinaire la résorption de ces matières très solubles se fait sans qu'elles aient eu le temps de subir une fermentation complète, et cela est bien heureux, surtout pour les fermentations acides, car ni les parois de l'estomac ni de l'intestin grêle ne semblent se prêter facilement à la résorption de leurs produits. Les selles de la malade de MM. Macfadyen, Nencki et Sieber étaient surtout diarrhéiques lorsqu'elles étaient très acides, et on sait que, chez les enfants, un lait déjà envahi par les fermentations lactiques amène souvent des irritations du tube digestif, que combat et arrête l'usage exclusif du lait stérilisé.

Les arrivées successives de la bile et du suc pancréatique dimi-

nuent l'acidité du chyme, et on admet même généralement qu'elles le font disparaître. Il n'en est pourtant rien. Tiedemann et Gmelin avaient confirmé l'observation de Prévost et Le Royer que, chez les ruminants, la réaction de l'intestin grêle était acide jusqu'à l'entrée dans l'iléon. Meissner avait constaté le même fait sur les carnivores, et Ewald, chez une malade affligée d'une fistule qui s'ouvrait, suivant toute apparence, à la partie postérieure de l'intestin grêle, avait vu que la réaction du contenu était neutre ou légèrement acide, mais jamais alcaline. MM. Macfadyen, Nencki et Sieber ont observé le même fait chez leur malade. En six mois d'observation ils n'ont trouvé qu'une fois la réaction neutre à la fistule, c'était après une ration de purée de pois. Toujours elle se montrait acide, et l'acidité, qui était en moyenne de un pour mille, calculée en acide acétique, s'est élevée une fois à 2 pour mille.

Ceci témoigne que l'action pancréatique s'accomplit le plus souvent en milieu acide, et c'est là un fait dont il faut tenir compte dans les expériences de digestion artificielle au moyen de ce suc. Mais avant d'en tirer une conclusion au point de vue de la physiologie de la digestion, il faut chercher d'où provient cette acidité, c'est-à-dire si elle est normale ou microbienne.

MM. Macfadyen, Nencki et Sieber ne se prononcent pas formellement sur ce point, mais on peut pourtant trouver dans leur mémoire quelques faits permettant de se faire une opinion. Ils disent, par exemple, que l'acidité de la masse en digestion est surtout due à des acides organiques, et en particulier à de l'acide acétique. Aucun réactif, violet de méthyle, réactif de Gunzbourg, n'a pu réussir à mettre en évidence la présence de l'acide chlorhydrique libre. D'un autre côté, on sait que la sécrétion de l'intestin grêle est rendue alcaline par du carbonate de soude; la réaction de la muqueuse du côlon, chez la malade étudiée, était souvent alcaline lorsque la masse en contact était acide. Pour expliquer ce fait, on ne peut guère invoquer la difficile imprégnation de la masse intestinale par les liquides sécrétés par les parois. En présence de cette sécrétion continue d'alcali, il n'y a à invoquer, comme explication du maintien de l'acidité dans la masse, qu'une production continue d'acides, et comme ces acides, quels qu'ils soient, sont de ceux qu'aucune diastase ne crée, et qui sont nécessairement des produits microbiens, il faut bien qu'il y ait une digestion microbienne plus ou moins intense dans l'intestin grêle, aussitôt que l'hyperacidité du chyme a disparu.

La bile, comme l'a montré en effet M. Macfadyen, n'est nullement un antiseptique. De plus, en cherchant par la méthode des plaques quels sont les microbes le plus fréquemment présents dans les matières qui s'écoulaient par la fistule, MM. Macfadyen, Nencki et Sieber ont surtout trouvé des ferment des matières hydrocarbonées. Cette partie

de leur mémoire, très développée, est impossible à résumer ici. Nous devons pourtant faire mention des propriétés de quelques-uns des microbes qu'ils ont isolés et étudiés.

La nature de ces microbes variait avec le mode d'alimentation, et elle vient à l'appui de cette proposition, sur laquelle j'ai si souvent insisté, qu'il y a digestion et digestion, et qu'on fait fausse route en traitant ce phénomène comme un phénomène unique. Parmi ceux qui ont été le plus souvent retrouvés, on en a isolé 7 que voici :

1^o Bacille court, analogue au *Bact. coli commune*, immobile comme lui, donnant comme lui avec le sucre de l'alcool éthylique, de l'acide acétique et de l'acide lactique, mais en différant en ce qu'il donne de l'acide lactique inactif, tandis que le *Bact. coli commune* donne de l'acide lactique droit. L'un et l'autre ne donnent rien avec les matières albuminoïdes;

2^o Un streptococcus, appelé *S. liquefaciens ilei v. acidi lactici*, qui n'agit guère aussi que sur le sucre, en le transformant partiellement en acide lactique inactif;

3^o Un bâtonnet court, à extrémités arrondies, peu mobile, qui ne s'attaque pas non plus à l'albumine, mais qui donne avec le sucre de l'acide lactique gauche, comme l'a constaté M. Frey. A raison de ce fait, on lui a donné le nom de *Bacterium ilei Frey*;

4^o Un bâtonnet mobile, à la façon des bacilles du choléra, s'attaquant peu au dextrose, et mieux à la viande; c'est le *B. liquefaciens ilei*;

5^o Un bâtonnet court et en forme de coccus, le *Bact. ovale ilei*, donnant avec le sucre de l'alcool et de l'acide paralactique;

6^o Un bacille mobile se comportant vis-à-vis du sucre comme le précédent;

7^o Un bâtonnet court, vraisemblablement identique avec le *Bact. lactis aerogenes* d'Escherich, qui est anaérobie et fait fermenter le sucre avec dégagement d'acide carbonique et d'hydrogène.

Comme on le voit, et comme on pouvait s'y attendre, la plupart de ces microbes sont des ferment des matières hydrocarbonées, ceux qui résistent le mieux à l'acide du suc gastrique et sont les plus disposés à se développer quand le chyme a reçu la bile et le suc pancréatique. Nul doute qu'ils n'exercent une action puissante pendant la douzaine d'heures que les aliments passent en moyenne dans l'intestin grêle, où du reste on retrouve ceux de leurs produits qui n'ont pas été résorbés, tels que l'acide acétique, les acides lactiques, l'acide succinique, mélangés à de la dextrine, du sucre et, à des acides gras résultant d'un commencement de saponification.

Le *quantum* de cette action microbienne sur les substances hydrocarbonées est difficile à établir. D'une part en effet les microbes ne sont pas la seule cause active, et le suc gastrique, le suc pancréatique

donnent, comme on le sait, des diastases analogues aux leurs. De l'autre, il y a une absorption puissante qui élimine, à mesure de leur formation, les produits de transformation des substances hydrocarbonées.

MM. Macfadyen, Nencki et Sieber n'ont pas cherché à résoudre ce problème, mais ils ont cru pouvoir tenter de répondre à la question suivante : Quelle est la part exercée par les fermentes des matières albuminoïdes dans le trajet au travers de l'estomac et de l'intestin grêle.

La réaction acide de la masse, son odeur faiblement putride et presque toujours faible semblaient bien indiquer qu'il n'y avait pas eu intervention active des fermentes de la putréfaction, « mais il était possible qu'à défaut des produits définitifs de ce phénomène, l'indol, le scatol, le phénol, les acides gras, on y trouvât au moins les premiers produits de la transformation des matières albuminoïdes, les acides amidés et aromatiques trouvés dans la fermentation anaérobiose de l'albumine ».

Une étude faite a montré qu'il n'y avait ni hydrogène sulfuré, ni mercaptan, ni leucine, ni tyrosine, ni d'autres acides que l'acide acétique et les acides lactiques qu'on peut supposer provenir de la fermentation des substances hydrocarbonées. On ne trouve guère que des peptones. De là, MM. Macfadyen, Nencki et Sieber concluent que « normalement, dans l'intestin grêle, les microbes n'ont aucune part, ou seulement une part très faible, à la décomposition de l'albumine ». L'affirmation me semble un peu excessive. Le premier effet de l'action des fermentes des matières albuminoïdes est la peptonisation ; c'est même là le seul effet des diastases qu'ils sécrètent : c'est un fait que j'ai, je crois, annoncé le premier et qui a été confirmé par M. Harris et Tooth. Ce n'est qu'ensuite, et en empruntant aux peptones leur matière alimentaire, que les microbes la transforment en ces corps divers que MM. Macfadyen, Nencki et Sieber ont cherché sans les trouver. Si, comme cela est sur, l'absorption intestinale des peptones est rapide, celles-ci peuvent échapper aux microbes avant d'avoir subi une dislocation plus profonde, et on ne peut par suite conclure de l'absence de ces produits de dislocation à l'absence de toute action microbienne. Contentons-nous de dire que l'action de ces microbes, dans l'intestin grêle, est sans doute faible sur les matières albuminoïdes, plus forte sur les matières hydrocarbonées, sans que rien ne nous indique encore le *quantum* de l'action, qui doit être du reste variable suivant les estomacs, les jours et les régimes alimentaires.

Dx.

NENCKI, Sur la présence du méthylmercaptopan dans l'urine humaine, après une consommation d'asperges, *Archiv. f. exp. Path. u. Pharmakol.*, t. XXVIII.

On sait que Nencki et N. Sieber ont trouvé le méthylmercaptopan parmi les produits de la putréfaction de l'albumine, et l'ont rencontré souvent depuis dans leurs recherches sur les produits microbiens. Il existe par exemple dans les gaz du gros intestin de l'homme. M. Macfadyen l'a trouvé au nombre des produits volatils du fromage de Camembert lorsqu'il est mûr. Comme il a une odeur analogue à celle que présente l'urine après qu'on a mangé des asperges, M. Nencki a eu l'idée de le rechercher dans ce liquide. A sa prière, quatre des élèves de son laboratoire ont consommé à deux reprises 12 kilos d'asperges, avec accompagnement de beurre et de thé, et leurs urines, de 8 heures après les repas, ont été distillées au bain de sable, avec 10 grammes d'acide oxalique. D'après le procédé recommandé par Nencki et M. Sieber, les gaz passaient au travers d'un flacon laveur renfermant une solution à 3 0/0 de cyanure de mercure; sitôt l'urine entrée en ébullition, on vit ce liquide se troubler et donner un précipité vert jaunâtre. Pour en séparer le mercaptan méthyle, on lave bien ce précipité, on le traite pendant qu'il est encore humide par quelques gouttes d'acide chlorhydrique dans un petit tube à essai, on chauffe ensuite à l'ébullition, et on dirige les vapeurs dans une solution fraîchement préparée de sous-acétate de plomb à 3 0/0. Le méthylmercaptopan, en arrivant au contact du sel de plomb, donne sur les parois du tube abducteur un précipité cristallin d'un jaune clair, et on perçoit en même temps l'odeur caractéristique du gaz. Il faut ne pas pousser trop loin l'opération pour éviter que l'acide chlorhydrique, en distillant à son tour, vienne dissoudre le précipité formé.

La quantité de matière recueillie avec l'urine était trop faible pour se prêter à une étude plus approfondie, mais les réactions qui précédent suffisent pour qu'on puisse affirmer que le méthylmercaptopan entre pour une part notable dans l'odeur spéciale que répand l'urine quand on a mangé des asperges. Le soufre de ce mercaptan vient sans doute de la matière albuminoïde, ou de l'asparagine, dans laquelle M. Loew en a découvert l'existence en faibles proportions.

Dx.

D. PARIETTI, Méthode de recherche du bacille typhique dans les eaux potables, *Rivista d'Igiene*, t. I, n° 11.

En faisant des recherches sur le meilleur moyen de découvrir dans une eau le bacille typhique, M. Parietti a fait une remarque qu'on

avait faite avant lui pour d'autres microbes, mais qui, dans le cas du bacille typhique, suffirait à elle seule pour expliquer quelques-unes des contradictions relevées à propos de sa résistance aux solutions phéniquées; c'est que la dose d'acide phénique capable d'arrêter le développement du bacille typhique dans une culture dépend, toutes choses égales d'ailleurs, de la quantité de semence introduite, de sorte qu'un même bouillon phéniqué restera limpide quand on y introduira seulement quelques germes, et se troublera quand ces germes seront plus nombreux.

Il est donc prudent, pour une recherche de cette nature, d'employer plusieurs bouillons inégalement phéniqués, et de les additionner de quantités variables d'eau suspecte. M. Parietti recommande la pratique suivante :

Il fait d'abord une solution acide de phénol, contenant 5 grammes d'acide phénique, 4 grammes d'acide chlorhydrique et 100 grammes d'eau distillée. Comme il est bien démontré maintenant que le bacille typhique supporte mieux qu'une foule d'autres microbes l'action de l'acide phénique et celle des milieux acides, cette solution acidulée de phénol convient très bien pour le mettre en évidence.

Dans des tubes à essai, contenant chacun 10^{cc} de bouillon de veau neutralisé, on ajoute 3, 6 et 9 gouttes de solution phéniquée; chaque goutte équivaut environ à 1/30 de centimètre cube. On agite pour bien mélanger; on place pendant quelque temps ces tubes à l'étuve, de façon à pouvoir séparer ceux qui auraient été éventuellement contaminés pendant la manipulation, puis on les ensemence par série avec des quantités graduellement croissantes (1,2... 10 gouttes) de l'eau à examiner. Les eaux ordinaires, sans bacilles typhiques, ne troublent d'ordinaire, au bout de 48 heures, que les bouillons qui renferment le moins d'acide phénique et le plus d'eau ensemencée. Le bacille typhique, quand il existe, amène le plus souvent un trouble au bout de 24 heures. Pour le caractériser, on fait avec ces cultures des plaques de gélatine, des cultures sur pommes de terre, des préparations colorées, etc. Dans les réactions à faire entrer en ligne de compte, M. Parietti signale avec justice, l'étude de la réaction de l'indol. Kitasato¹ a montré que, contrairement à beaucoup d'autres bacilles qui pourraient être confondus avec lui, le bacille typhique ne donne pas cette réaction dans les cultures où il a poussé.

Dx.

1. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. VII, 1889.

INSTITUT PASTEUR

Personne morte de rage pendant le traitement.

FRIDY (Mohammed Djeguinine), 23 ans, soldat au 4^e régiment de tirailleurs à Sfax (Tunisie). Mordu vers le 2 mai par un chien errant, qui a été abattu aussitôt. La main gauche porte 4 morsures, la main droite 5 morsures; ces blessures sont pénétrantes et ont saigné; un médecin les a cautérisées au fer rouge cinq heures après qu'elles ont été faites.

Fridy a été mis en traitement le 22 mai. Les premiers signes de la rage se sont manifestés le 5 juin par de la tristesse, de la céphalalgie, des douleurs dans le bras gauche, partant de la cicatrice des morsures. La rage est confirmée le 7 juin et Fridy succombe le 12 juin à la rage convulsive. (Observation de M. le professeur Kelsch, du Val-de-Grâce.)

Personne traitée morte de rage.

FROUIN (Gaston), 16 ans 1/2, de Cubzac-les-Ponts (Gironde). Mordu par un chien, le 27 avril 1891, à la main droite, qui porte sur l'éminence hypothénar deux morsures profondes. Les blessures ont saigné et n'ont pas été cautérisées. Le chien mordreux a été reconnu enragé par M. Dureau, vétérinaire à Saint-André-de-Cubzac.

Frouin a été traité du 3 au 20 mai. Il est tombé malade le 28 mai et a succombé à la rage paralytique le 1^{er} juin. (Observations du Dr Cherron.)

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE¹ DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — MAI 1891.

	A	B	C
Morsures à la tête { simples	» 1	» 3	» »
et à la figure { multiples	4	4	» »
Cautérisations efficaces	» 3	» 3	» »
— inefficaces	4	2	» »
Pas de cautérisation	3	1	» »
Morsures aux mains { simples	» 13	» 15	» 6
et multiples	22	42	8 14
Cautérisations efficaces	» 9	» 27	» 1
— inefficaces	4	4	» »
Pas de cautérisation	12	17	4 »
Morsures aux membres et au tronc { simples	9	21	9 »
et multiples	» 4	» 5	» 4
Cautérisations efficaces	6	10	10 14
— inefficaces	» 4	20	» 1
Pas de cautérisation	9	» 15	» 9
Habits déchirés	7	18	12 »
Morsures à nu	3	2	2 »
Morsures multiples en divers points du corps	» »	» 1	1 1
Cautérisations efficaces	» »	» »	» »
— inefficaces	» »	1	» »
Pas de cautérisation	» »	» »	1 »
Habits déchirés	» »	4	4 »
Morsures à nu	» »	» »	» »
Totaux. { Français et Algériens	28	54	23
Etrangers	8 36	12 66	6 29
	A	B	C
TOTAL GÉNÉRAL			131

4. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 124 fois; chats, 6 fois; cheval, 2 fois; âne, 1 fois.

Le Gérant : G. MASSON.
